

Untersuchungen zum stickstoffinduzierten Phycobilisomenabbau - NblA, ein kleines Protein mit großer Wirkung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Antje Baier

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht PhD

Gutachter/in:

1. Herr Prof. Dr. Lockau
2. Frau Prof. Dr. Wilde
3. Herr Prof. Dr. Turgay

Datum der Disputation: 06.12.2013

Je weiter sich unser Gehirn entwickelt, umso weniger sind wir fähig zu erkennen, dass es auch Probleme gibt, die einfach zu lösen sind.

Helga Schäferling (*1957), deutsche Sozialpädagogin

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	7
1. EINLEITUNG	8
1.1 CYANOBAKTERIEN	8
1.1.1 <i>Synechocystis spec PCC 6803</i>	8
1.1.2 <i>Nostoc spec PCC 7120</i>	9
1.2 ATP-ABHÄNGIGE PROTEOLYSE	9
1.2.1 <i>Clp(caseino-lytic proteases)-Proteasen</i>	10
1.2.2 <i>FtsH(filamentation temprature-sensitive protein H)-Proteasen</i>	11
1.2.3 <i>Lon(long cells)-Proteasen</i>	12
1.2.4 <i>HslUV(heat shock locus genes U and V)-Proteasen</i>	12
1.2.5 <i>AAA⁺-ATPase – der Chaperonpartner</i>	12
1.2.6 <i>Substraterkennung – kovalente Markierung und Adapterproteine</i>	14
1.2.6.1 SsrA-Tag	14
1.1.1.1. N-End-Regel (N-end rule)	15
1.2.6.2 Adapterproteine	15
1.3 OXYGENE PHOTOSYNTHESE	15
1.3.1 <i>Phycobilisomen - die Lichtsammelkomplexe der Cyanobakterien</i>	16
1.3.2 <i>Lichtreaktion</i>	19
1.3.3 <i>Kohlenstoffassimilation</i>	20
1.4 STICKSTOFFASSIMILATION	22
1.4.1 <i>Koordination des Stickstoff- und Kohlenstoffstoffwechsels</i>	23
1.5 ANPASSUNG AN NÄHRSTOFFMANGEL	24
1.5.1 <i>Mechanismus des PBS-Abbaus</i>	27
1.6 ZIEL DER ARBEIT	30
2. ERGEBNISSE	32
2.1 NBLA ₇₁₂₀ EIN ADAPTERPROTEIN DES CHAPERONS CLPC	32
2.1.1 <i>Konstruktion von NblA-GFP Varianten</i>	32
2.1.2 <i>Analyse der Expression von NblA₇₁₂₀</i>	34
2.2 IST DER NBLA-INDUZIERTER PBS-ABBAU EIN UNIVERSELLES SYSTEM?	37
2.2.1 <i>NblA₇₁₂₀ interagiert mit homologen ClpC-Proteinen</i>	37
2.3 SYNECHOCYSTIS 6803- EIN SONDERFALL?	39
2.3.1 <i>Kann NblA₇₁₂₀ den nicht bleichenden Phänotyp der nblA1- und nblA2-defizienten Doppelmutante aus Synechocystis 6803 komplementieren</i>	39
2.4 NBLA1 UND NBLA2 HOMO- ODER HETERODIMER?	41
2.4.1 <i>Charakterisierung von rekombinanten NblA1 und NblA2</i>	41
2.4.1.1 <i>Sekundärstruktur und Oligomerisierungszustand von NblA1 und NblA2</i>	41

2.4.2	<i>In vitro</i> -Untersuchungen zur Interaktion von NblA1 und NblA2	45
2.4.3	<i>In vivo</i> -Untersuchungen zur Interaktion von NblA1 und NblA2	48
2.4.3.1	Konstruktion und Untersuchung der Mutanten	49
2.4.3.2	Messungen der NblA1/NblA2 Heterodimerisierung mittels FRET	56
2.4.4	Interaktion von NblA1 und NblA2 mit ClpC ₆₈₀₃ und den PBP	60
2.4.5	NblA1 interagiert ohne NblA2 mit den PBP und ClpC ₆₈₀₃	62
2.5	UNTERSUCHUNGEN ZUM NBLA-INDUZIERTEN ABBAU DER PBS DURCH EINE CLP-PROTEASE	64
2.5.1	Identifizierung der Clp-Homologe aus <i>Synechocystis</i> 6803	64
2.5.2	Expression und Reinigung von ClpP1-His/ClpR	66
2.5.3	Ist der proteolytische Komplex aus ClpC ₆₈₀₃ -ClpP1-His/ClpR funktionell?	68
2.5.4	Abbau von NblA1 und NblA2	70
2.5.5	Detektion des proteolytischen Abbaus durch Fluoreszenzabnahme	71
2.5.6	Werden NblA1 und NblA2 posttranslational reguliert?	74
2.5.7	Untersuchungen des PBS-Abbaus in einer Glykogen-Synthase defizienten Mutante	74
2.5.8	Untersuchung der Heterodimerisierung von NblA1 und NblA2	76
3.	DISKUSSION	79
3.1	PBS-ABBAU IN CYANOBAKTERIEN, EIN UBIQUITÄRER MECHANISMUS?	79
3.2	NBLA1 UND NBLA2 - EIN HETERODIMER	79
3.3	DAS HETERODIMER AUS NBLA1/NBLA2 INTERAGIERT MIT PBP UND CLPC	81
3.4	REGULATION VON NBLA	82
3.5	IDENTIFIZIERUNG DER AM PBS-ABBAU BETEILIGTEN CLP-PROTEASE	84
3.6	NBLA-ABBAU	85
3.7	WIRD NBLA POSTTRANSLATIONAL REGULIERT?	88
3.8	SCHLUSSBETRACHTUNG	90
4.	MATERIAL UND METHODEN	92
4.1	MATERIAL	92
4.1.1	Chemikalien	92
4.1.2	Filter und Membranen	93
4.1.3	Molekulargewichtsmarker	94
4.1.4	Enzyme	94
4.1.5	Oligonukleotide	95
4.1.6	Antikörper	96
4.1.7	Geräte	96
4.1.8	Plasmide	97
4.1.9	Lösungen, Stammlösungen und Puffer	102
4.1.10	Mikroorganismen:	102
4.2	METHODEN	105
4.2.1	Mikrobiologische Standardmethoden	105

4.2.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	105
4.2.1.2	Kultivierung von <i>Nostoc</i> 7120 und <i>Synechocystis</i> 6803	105
4.2.1.3	Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen	106
4.2.1.4	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen nach Hanahan	107
4.2.1.5	Transformation von <i>E. coli</i>	107
4.2.1.6	Konjugation von <i>Nostoc</i> 7120 und <i>Synechocystis</i> 6803	108
4.2.1.7	Stickstoffentzug aus dem Medium	109
4.2.2	Allgemeine Methoden	110
4.2.2.1	Absorptionsspektren ganzer Zellen	110
4.2.2.2	Emissionsspektren	110
4.2.2.3	Lebenszeitmessung von Cer	110
4.2.2.4	Fluoreszenzmikroskopie	111
4.2.2.5	BLAST-Analyse	111
4.2.2.6	Multiples Sequenzalignment	111
4.2.2.7	Identifizierung von möglichen Phosphorylierungsstellen im NblA-Protein.	111
4.2.3	Molekularbiologische Methoden	112
4.2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	112
4.2.3.2	DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	112
4.2.3.3	Ortsgerichtete Mutagenese nach Wang und Malcom (2002)	113
4.2.3.4	Konzentrationsbestimmung von DNA	113
4.2.3.5	DNA-Spaltung mithilfe von Restriktionsendonukleasen	113
4.2.3.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	113
4.2.3.7	Erzeugung von 3'-Einzelüberhängen durch Adenylierung	114
4.2.3.8	Dephosphorylierung des 5'-Endes von linearisierten Vektoren	114
4.2.3.9	Ligation	114
4.2.3.10	DNA-Sequenzierung	115
4.2.3.11	Konstruktion der Plasmide zur Expression von NblA-Fusionsproteinen in <i>Nostoc</i> 7120	115
4.2.3.12	Konstruktion von Plasmiden zur Expression in <i>Synechocystis</i> 6803	115
4.2.3.13	Konstruktion von Plasmiden zur Expression in <i>E. coli</i>	116
4.2.4	Biochemische Methoden	119
4.2.4.1	Native Gelelektrophorese	119
4.2.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	119
4.2.4.3	Immunoblotanalyse	120
4.2.4.4	Bestimmung der Chl <i>a</i> -Konzentration	121
4.2.4.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	122
4.2.4.6	DOC/TCA-Fällung von Proteinen	122
4.2.4.7	Heterologe Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	122
4.2.4.8	Herstellung von Zellextrakten	123
4.2.4.9	Reinigung von NblA aus <i>Nostoc</i> 7120 und NblA2 aus <i>Synechocystis</i> 6803 mittels Ammoniumsulfatfällung und Größenausschlusschromatografie	123
4.2.4.10	Reinigung von GST-Fusionsproteinen mittels Glutathion-Agarose	124
4.2.4.11	Reinigung von His-Fusionsproteinen mittels Ni-IDA-Resins	125
4.2.4.12	Größenausschlusschromatografie	125

4.2.4.13	<i>In vitro</i> -pulldown-Analysen	126
1.1.1.1	<i>Isolierung von PBS aus Gesamtzellextrakt von Synechocystis 6803</i>	128
4.2.4.14	Proteolytischer Abbau von Proteinen <i>in vitro</i>	128
	Detektion des proteolytischen Abbaus durch eine SDS-PAGE	128
	Detektion des proteolytischen Abbaus durch Fluoreszenzabnahme	129
4.2.4.15	Aufnahme von CD-Spektren	129
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS		130
LITERATURVERZEICHNIS		134
PUBLIKATIONSLISTE		156
CURRICULUM VITAE		157

Zusammenfassung

Der Abbau der Phycobilisomen unter Stickstoffmangel, der sich in einem drastischen Farbumschlag von blau-grün nach gelb-grün widerspiegelt, ist in Cyanobakterien ein ubiquitärer Mechanismus. Essenziell für den Abbau ist das kleine Protein NblA. Das in *Nostoc* sp. PCC 7120 gut untersuchte ~7 kDa große Protein interagiert als Homodimer mit den Phycobilisomen und dem Chaperon ClpC. Soweit bekannt kodieren alle Phycobilisomen-besitzenden Cyanobakterien ein essenzielles NblA-Protein. Der Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803, dagegen kodiert mit NblA1 und NblA2 sogar zwei für den Phycobilisomenabbau entscheidende Proteine.

In dieser Arbeit konnte erstmalig durch *in vitro* und *in vivo* Interaktionsstudien mithilfe von *pull down*-Versuchen und Försterresonanzenergietransfer gezeigt werden, dass NblA1 und NblA2 als biologisch aktive Form ein Heterodimer bilden. *In vitro-pulldown*-Versuche zeigten außerdem für *Synechocystis* sp. PCC 6803 eine Interaktion des Heterodimers mit den Phycobilisomen und ClpC. Durch die Ausbildung dieses ternären Komplexes markiert NblA1/NblA2 die Phycobilisomen für den Abbau durch eine Clp-Protease mit ClpC als Chaperonpartner.

In Photobionten gibt es eine Reihe von *clp*-Genen, so besitzen Cyanobakterien, soweit bekannt, neben vier regulatorischen Chaperongenen, zu denen auch ClpC zählt, vier proteolytische Untereinheiten. Aus diesen bilden sich, wie für *Synechococcus elongatus* PCC 7942 gezeigt, gemischte Heptamere aus je zwei Clp-Untereinheiten. Zwei lösliche, im Cytoplasma vorkommende Proteasen wurden bis jetzt zweifelsfrei identifiziert, eine dritte, an der Thylakoidmembran assoziierte Protease wird außerdem vermutet. Diese putative Protease, vermutlich aus dem Chaperon ClpC und den proteolytischen Untereinheiten ClpP1 und ClpR aufgebaut, wurde durch eine BLAST-Analyse auch im Genom von *Synechocystis* sp. PCC 6803 identifiziert. Mittels Koexpression und –reinigung konnte ein funktioneller proteolytischer Kern, bestehend aus ClpR und ClpP1 gereinigt werden, der zusammen mit dem Chaperon ClpC eine aktive Clp-Protease bildet. Durch Größenausschlusschromatografie und Untersuchungen zur Proteaseaktivität konnte diese dann erstmalig charakterisiert werden. Des Weiteren zeigten *in vitro*-Degradationsversuche mit der aktiven Protease zweifelsfrei, dass das NblA1/NblA2-Heterodimer durch ClpC-ClpP1/ClpR abgebaut wird. Der Abbau von NblA1/NblA2 kann demnach auch ohne ein Substrat durch die Protease erfolgen.

Unter Stickstoffmangel kommt es in *Synechocystis* sp. PCC 6803 somit zu einer Expression von NblA1 und NblA2. Das Heterodimer bindet an die Phycobilisomen und markiert diese so für den Abbau durch die an der Thylakoidmembran lokalisierte Clp-Protease ClpC-ClpP1/ClpR. Die Regulation von NblA erfolgt, wie für viele Adapterproteine üblich, über seine Expression und die Kontrolle seiner Konzentration durch den Abbau des Heterodimers zusammen mit seinem Substrat, den Phycobilisomen.

1. Einleitung

1.1 Cyanobakterien

Cyanobakterien sind Gram-negative Bakterien, die ein eigenes Phylum im Reich der *Bacteria* einnehmen. Die heterogene Gruppe zeichnet sich als einziger Vertreter unter den Prokaryoten durch die Fähigkeit aus oxygene Photosynthese zu betreiben. Durch ihren vielseitigen Metabolismus sind Cyanobakterien weit verbreitet und passen sich schnell an veränderte Bedingungen ihrer Umwelt, wie Lichtintensität, Lichtqualität und variierende Nährstoffverfügbarkeit, an [1, 2]. Diese hohe Anpassungsfähigkeit hat dazu geführt, dass Cyanobakterien im Laufe ihrer langen Evolution die unterschiedlichsten belichteten Lebensräume erschließen konnten [3]. So findet man sie auf der ganzen Welt in Süßwasser, Brackwasser, Salzwasser, Thermalquellen, im Boden sowie in nährstoffarmen oder extremen Grenzbiotopen [4]. Darüber hinaus gibt es vielfältige Cyanobaktériensymbiosen, in denen die Bakterien ihren Wirt mit Photosyntheseassimilaten und/oder Stickstoff versorgen. Aufgrund dieser Eigenschaften nehmen Cyanobakterien eine dominante Rolle in der globalen Stickstoff- und Kohlenstoffassimilation ein.

Fossile Funde, die bis zu 3,5 Milliarden Jahre zurückreichen [5], belegen die Annahme, dass Vorläufer der heutigen Cyanobakterien die ältesten oxygene Photosynthese betreibenden Organismen sind. Sie waren daher wahrscheinlich für den Wandel der reduzierenden Atmosphäre in eine Oxidierende verantwortlich. Außerdem gelten Cyanobakterien gemäß der Endosymbiontentheorie als Vorläufer der Chloroplasten von Algen und höheren Pflanzen [6].

Morphologisch sind Cyanobakterien eine sehr vielseitige Gruppe. So gibt es einzellige (z. B. *Synechocystis*, *Synechococcus*) und filamentöse Arten (z. B. *Anabaena*, *Nostoc*, *Lyngbya*) sowie solche die in Zellaggregaten auftreten (z. B. *Gloeotheca*).

In dieser Arbeit wurde mit dem einzelligen Cyanobakterium *Synechocystis* spec PCC 6803 (*Synechocystis* 6803) und dem filamentösen Cyanobakterium *Nostoc* spec PCC 7120 (*Nostoc* 7120) gearbeitet.

1.1.1 *Synechocystis* spec PCC 6803

Synechocystis 6803 ist ein im Frischwasser lebendes, nicht stickstofffixierendes, einzelliges Cyanobakterium. Es zeichnet sich durch seine leichte Transformierbarkeit und seine physiologische Anpassungsfähigkeit aus. So ist *Synechocystis* 6803 nicht wie viele andere Cyanobakterien obligat phototroph, sondern kann in Anwesenheit von Glucose auch mixotroph und heterotroph wachsen.

1996 wurde das Genom von *Synechocystis* 6803 als erstes Genom eines phototrophen Cyanobakteriums vollständig sequenziert [7]. Es besteht aus einem $3,57 \times 10^6$ Bp großem, zirkulären Chromosom und sieben Plasmiden (insgesamt $0,38 \times 10^6$ Bp groß).

Dank seiner Fähigkeit auch heterotroph zu wachsen ist *Synechocystis* 6803 der meist genutzte Organismus zur Untersuchung der Photosynthese und der Lichtsammelkomplexe von Cyanobakterien und ist durch seine genetische Manipulierbarkeit ein beliebter Organismus für molekularbiologische Untersuchungen.

1.1.2 *Nostoc* spec PCC 7120

Nostoc 7120 ist ein filamentöses, diazotrophes Cyanobakterium, das im Frischwasser lebt. Bei einem Mangel an Stickstoffverbindungen differenzieren sich 5-10 % der Zellen entlang eines Filaments zu Heterozysten aus, die auf die Fixierung von molekularem Stickstoff spezialisiert sind [8]. Im Jahre 2001 wurde das Genom von *Nostoc* 7120 vollständig sequenziert [9]. Es besteht aus einem 6,4 Mbp großen Chromosom sowie 6 Plasmiden mit einer Größe von insgesamt 0,8 Mbp.

Da *Nostoc* 7120 durch triparentale Konjugation genetisch manipulierbar ist [10], ist es ein beliebter Modelorganismus für molekularbiologische Untersuchungen. Häufige Verwendung findet es dabei vor allen für Untersuchungen der Zell-Zell-Interaktion, der Zelldifferenzierung und der Stickstofffixierung.

1.2 ATP-abhängige Proteolyse

Die Fähigkeit von Zellen oder Zellverbänden, sich an verändernde Umweltbedingungen anzupassen, ist für ihr Überleben essentiell. Ein zentraler Bestandteil für die Adaption an verschiedene Umweltbedingungen ist die regulierte, energieabhängige Proteolyse. Diese spielt eine Schlüsselrolle in der Zellphysiologie aller Organismen, da durch sie die Verfügbarkeit kurzlebiger Regulatorproteine bestimmt, die Akkumulation geschädigter Proteine verhindert und damit die Proteinhomöostase gewährleistet wird [11, 12].

In allen drei Domänen des Lebens, Archaeobakterien, Bakterien und Eukaryoten hat man proteolytische Systeme gefunden, die kontrolliert und energieabhängig endogene Proteine abbauen. Dabei ist die Struktur der Proteasen sehr ähnlich (Abbildung 1.1). Alle bestehen aus zwei funktionalen Elementen: dem proteolytischen Zylinder mit dem katalytischen Zentrum und dem Chaperonpartner, dessen Ringe auf beiden Seiten mit dem Zylinder assoziieren können [13]. Die Chaperonringe gehören zu den AAA^+ -ATPasen und sind verantwortlich für die Substratauswahl und -bindung [14]. Sie entfalten dieses ATP-abhängig und translozieren es in die proteolytische Kammer, wo es durch die katalytische Aktivität der Protease zu Peptiden degradiert wird [13].

In Eukaryoten und Archaeen ist die wichtigste energieabhängige Protease das 26S-Proteasom, das aus vier übereinanderliegenden Ringen gebildet wird. Die zwei inneren β -Ringe beinhalten das aktive Zentrum, die beiden äußeren Ringe binden die ATPase [13]. Die ATPase der Archaea ist aus einer einzigen Untereinheit (PAN) aufgebaut, über deren Substraterkennung bis jetzt nichts bekannt ist [15]. In Eukaryoten setzt sich der Chaperonpartner, das 19S-Chaperon aus verschiedenen

Untereinheiten zusammen, die nicht zwangsläufig ATPase-Aktivität besitzen. Hier werden durch Polyubiquitinierung für den Abbau markierte Substrate durch das Proteasom erkannt und abgebaut [16] .

In Bakterien können dagegen vier verschiedene energieabhängige Proteasen vorkommen, die auch in den Organellen von Eukaryoten (Mitochondrien, Chloroplasten) zu finden sind, die: Clp-, HslUV-(auch ClpYQ-), Lon-und FtsH-Proteasen.

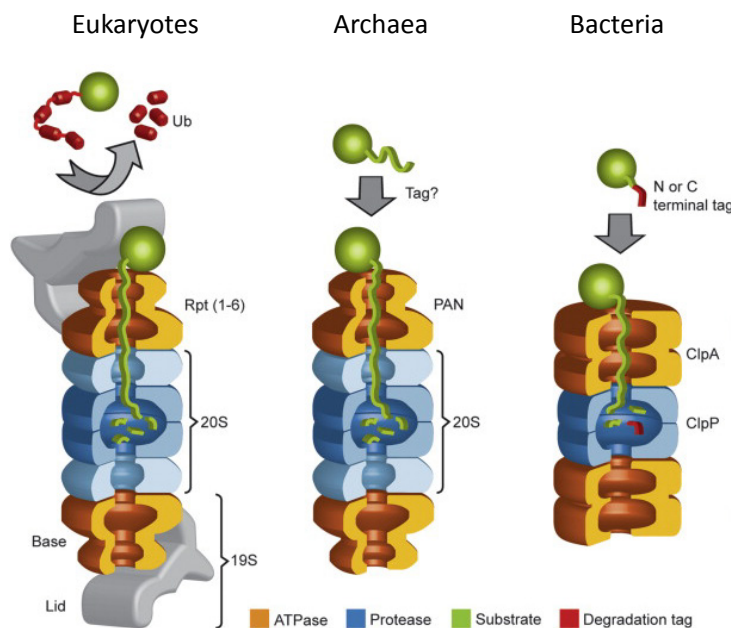


Abbildung 1.1: Die verwandten Chaperonproteasen aus Eukaryoten, Archaea und Bakterien. Die architektonisch verwandten Chaperonproteasen bestehen aus einem zylindrischen Kern, der Protease (blau) und dem ringförmigen Chaperonpartner, der mit dem katalytischen Kern assoziiert ist (gelb). Das Chaperon ist für die Bindung des Substrates verantwortlich, entfaltet es ATP-abhängig und transloziert es in die proteolytische Kammer [13] .

1.2.1 Clp(caseino-lytic proteases)-Proteasen

Die zur Familie der Serinproteasen gehörenden Clp-Proteasen sind lösliche Proteinkomplexe, die sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammensetzen. Sie sind die am besten untersuchte proteolytische Familie in Prokaryoten und Chloroplasten. Clp-Proteine sind weit verbreitet und übernehmen in verschiedenen Organismen die unterschiedlichsten Aufgaben, sie nehmen z. B. eine bedeutende Funktion bei der Antwort auf Stressbedingungen [17, 18] , Nährstoffmangel [19] oder der Degradation von falsch gefalteten oder beschädigten Proteinen ein [20, 21] . Ein typischer Clp-Komplex besteht aus einem „Fass“, der proteolytisch aktiven Peptidase ClpP und dem ClpP-flankierenden-Chaperonpartner, der die proteolytische Aktivität reguliert. Die durch zwei heptamere Ringe gebildete proteolytische Kammer beinhaltet die katalytische Triade (Ser-97, His-22 und Asp-171), durch die Substrate gebunden und degradiert werden. ClpP allein hat nur eine geringe Peptidaseaktivität, die erst durch die flankierenden hexameren Ringe des Chaperonpartners zunimmt. Als Chaperonpartner können ClpA, ClpC, ClpD oder ClpX agieren [22, 23, 24] . Die Bindung

zwischen Chaperon und proteolytischen Kern wird bei ClpA in *E. coli* durch sogenannte P-Loops in der C-terminalen Domäne von ClpA/ClpX vermittelt, die an den äußeren Rand des ClpP-Fasses binden [25, 26, 27]. Daneben sind axiale Loops in der N-Domäne von ClpP für die Interaktion entscheidend [28, 29, 30, 31].

In Photobionten gibt es, im Gegensatz zu anderen Organismen, mehr als eine Protease der Clp-Familie. So besitzen die in dieser Arbeit verwendeten Cyanobakterien *Synechocystis* 6803 und *Nostoc* 7120 acht orthologe *clp*-Gene, die für vier regulatorische Chaperonproteine (ClpC, ClpB1, ClpB2 und ClpX) und vier proteolytische Untereinheiten (ClpP1, ClpP2, ClpP3, ClpR) kodieren [32]. ClpR ist dabei eine nur in photosynthetischen Organismen vorkommende Variante des ClpP, dem die katalytische Triade fehlt. Ergebnisse aus *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (im weiteren *Synechococcus* 7942) zeigen, dass die vier proteolytischen Untereinheiten gemischte Heptamere bilden, die entweder mit ClpC oder ClpX assoziieren können. Als Kombinationen des proteolytischen Kerns wurden ClpP1/ClpP2, die mit ClpX assoziiert sowie ClpP3/ClpR im Komplex mit ClpC, identifiziert. Neben den beiden löslichen, im Cytoplasma vorkommenden Proteasen wird eine dritte, an die Thylakoidmembran gebundene Variante, bestehend aus ClpP1 und ClpR im Komplex mit ClpC, vermutet. Diese putative Protease konnte jedoch nur durch *cross linking*-Experimente im Gesamtzellextrakt identifiziert werden [33].

Die beiden untersuchten Proteasen übernehmen in der Zelle unterschiedliche Aufgaben, so ist ClpX-ClpP1/ClpP2 bei der Antwort auf verschiedene Stressbedingungen, wie Starklicht und Kältestress involviert, während der konstitutiv exprimierte ClpC-ClpP3/ClpR-Komplex essentiell für die Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase ist [34, 35].

1.2.2 FtsH(filamentation temprature-sensitive protein H)-Proteasen

Die bakterielle FtsH-Protease ist eine membranständige, zinkabhängige Metalloprotease, die in vielen intrazellulären Degradationsprozessen beteiligt ist [36, 37]. Sie ist in der Lage cytosolische und membranständige Substrate abzubauen.

Anders als Clp-Proteasen bestehen FtsH-Proteasen nicht aus Peptidase und Chaperonpartner, sondern vereinen die Chaperon- und Peptidaseaktivität auf einem Polypeptid. Dabei ragen der kurze N-Terminus und die lange C-terminale Domäne ins Cytoplasma bzw. Stroma der Chloroplasten, während der N-terminale Bereich die Membran zweimal durchspannt [38, 39, 40]. Der cytoplasmatische, C-terminale Bereich beinhaltet die AAA-ATPase, die Zn^{2+} -Metalloprotease und eine Leucin-*zipper*-Domäne und ist für die Ausbildung des katalytisch aktiven Hexamers verantwortlich [41, 42].

FtsH-Proteasen scheinen eine große Rolle bei der Qualitätskontrolle von Membranproteinen zu spielen. Der Abbau von Proteinen wird an cytosolischen Regionen initiiert [43]. Dabei ist ein

Peptidschwanz von mindestens 20 Aminosäuren erforderlich [44]. FtsH kann im Gegensatz zu vielen anderen bakteriellen ATP-abhängigen Proteasen die Proteolyse von Substraten nicht fortsetzen, wenn es auf eine straffgefaltete Domäne trifft, was für eine vergleichsweise niedrige Entfaltungsaktivität der Protease spricht [45].

In *Synechocystis* 6803 konnten vier putative FtsH-Proteasen identifiziert werden [7, 46]. Zwei FtsH-Proteasen (FtsH1 und FtsH3) sind dabei für *Synechocystis* 6803 essentiell und somit wahrscheinlich an der Qualitätskontrolle und Regulation von Membranproteinen beteiligt, während die Deletion von FtsH4 zu keiner Veränderung des Phänotyps führt [46]. Die FtsH2-Protease spielt gemeinsam mit FtsH3 als Heterohexamer [47], eine Rolle in der D1-Degradierung [48, 49] und ist in der Biogenese und Degradierung von PSII-Untereinheiten involviert [50, 51].

1.2.3 Lon(*long cells*)-Proteasen

Die Lon-Protease ist eine cytoplasmatische Serinprotease, die Chaperon- und Peptidaseaktivität auf einem Polypeptid vereint. Sie ist ein wichtiges Regulatorprotein unter Stressbedingungen und katalysiert den Abbau von abnormen Proteinen [52]. Anders als die FtsH- und Clp-Proteasen ist die aktive Form der Protease ein Homotetramer, das keinen Partner für die Peptidaseaktivität benötigt.

1.2.4 HslUV(heat shock locus genes U and V)-Proteasen

Die Threonin-Protease HslUV (auch ClpYQ genannt) ist ähnlich der Clp-Protease aufgebaut. Wie bei Clp agiert HslU als ATPase, während HslV den proteolytischen Kern bildet, der jedoch aus zwei Homohexameren besteht [53].

1.2.5 AAA⁺-ATPase – der Chaperonpartner

In der Bakterienzelle werden viele Prozesse durch Mitglieder der AAA⁺-Superfamilie gesteuert, so sind die Chaperone nicht nur die regulatorische Komponente bei der energieabhängigen Proteolyse, sondern spielen auch als molekulare Chaperone eine wichtige Rolle in der Zelle [54]. Chaperone, wie das Hsp70/DnaK sind in der Lage an entfaltete Regionen von Proteinen zu binden und diese dadurch vor unspezifischen Interaktionspartnern zu schützen. Andere Chaperone, wie das Hsp60/GroEL-GroES können das Protein so isolieren, dass es sich nativ faltet [55]. Der exakte Mechanismus für molekulare Chaperone ist noch nicht bekannt, jedoch steht fest, dass Hsp100-Chaperone wie ClpB zusammen mit DnaK in der Lage sind große Proteinaggregate zu renaturieren [54, 56, 57].

Die AAA⁺-Superfamilie beinhaltet die Clp/HSP100-Chaperone [22] und die AAA(ATPases associated with a variety of cellular activities)-Chaperone [58], die von der Thermotoleranz bis zur Regulation der Transkription [59, 60, 61, 62] ein breites Wirkungsspektrum besitzen. Trotz der mannigfaltigen Wirkungsweisen besitzen die Chaperone aber einen gemeinsamen Mechanismus und eine ähnliche Struktur.

Charakteristisch ist die aus 220 Aminosäuren bestehende AAA-Domäne, die mit dem α/β Rossman Fold und den Domänen für die ATP-Bindung und -Hydrolyse (Walker A und Walker B) mehrere konservierte Bereiche enthält. Anhand dieser AAA-Domäne werden die Chaperone in zwei Klassen unterteilt, Klasse I (z.B. ClpA, ClpB, ClpC) besitzt zwei AAA-Domänen, wohingegen Klasse II (ClpX, HslU) nur eine AAA-Domäne besitzt. Zusätzlich kommen noch verschiedene Domänen vor, die nicht stark konserviert sind und für die Aufgaben der einzelnen Chaperone entscheidend sind (Abbildung 1.2). So besitzen ClpX und ClpE ein Zinkbindemotiv am N-Terminus, ClpA, ClpB und ClpC eine N-Domäne, die eine Rolle bei der Substratbindung spielt und HslU eine I-Domäne für die Substratbindung [63, 64, 65].

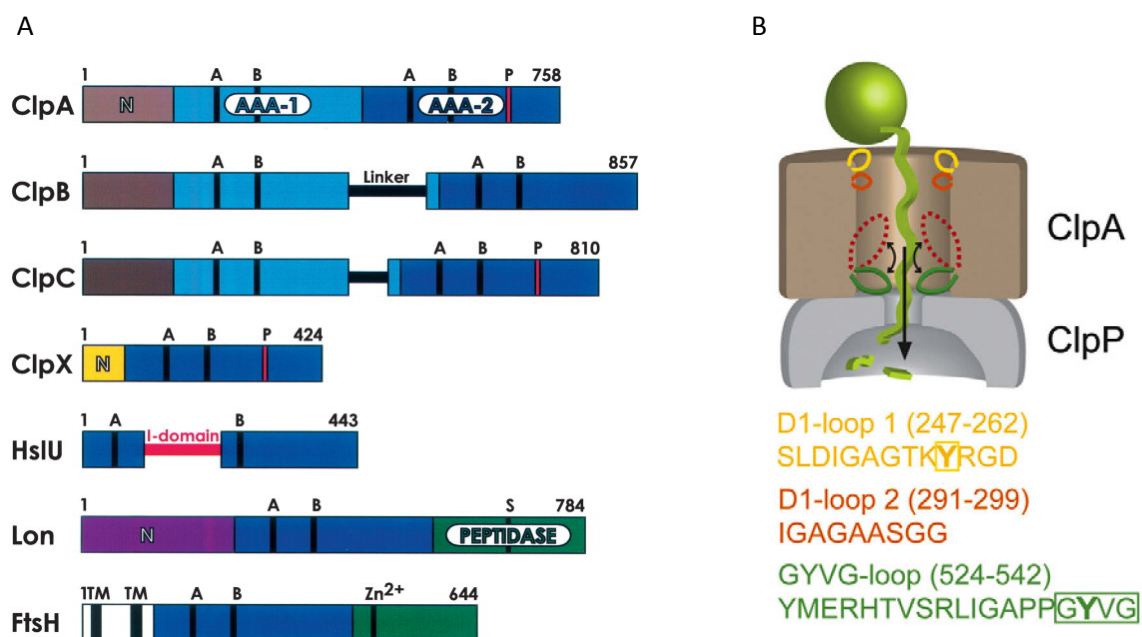


Abbildung 1.2: Struktur der AAA⁺-Proteine und der Mechanismus der ATP-Hydrolyse. **A:** Gezeigt ist die ein Schema der Struktur verschiedener AAA⁺-Proteine. Die AAA-Domänen sind blau gekennzeichnet, das Walker A (A) und -B Motiv (B) durch schwarze Balken markiert und die verschiedenen N-Domänen durch den Buchstaben N gekennzeichnet. Die Transmembranhelices (TM) von FtsH sind durch schwarze Balken markiert. Des Weiteren sind die Peptidasedomänen grün markiert und das Zinkbindemotiv (Zn²⁺) der Metalloprotease FtsH gekennzeichnet [66]. **B:** Dargestellt ist die Translokation eines Substrats durch die zentrale Pore des Chaperons ClpA in die proteolytische Kammer von ClpP. Gezeigt sind dabei die Loops, die in den zentralen Kanal hineinragen. Der Loop mit dem konservierten GYVG-Motiv ist in grün/rot dargestellt [13].

Als biologisch aktive Form bilden die AAA⁺-Enzyme hexamere Ringe, die als Chaperon makromolekulare Proteinkomplexe auflösen und Proteinaggregate solubilisieren, oder mit einer Protease interagieren. Substrate können dabei auf zwei verschiedene Weisen erkannt werden, entweder direkt durch das Chaperon oder über Adapterproteine, die mit dem Substrat und dem Chaperon interagieren. Um eine große Varianz an Proteinen abbauen zu können und trotzdem ein unspezifische Degradation von Proteinen zu verhindern, werden häufig Tags verwendet um Proteine für den Abbau zu markieren.

Der Mechanismus der ATP-abhängigen Entfaltung und Translokation der Proteine ist für alle AAA⁺-Proteine ähnlich, jedoch ist der genaue Mechanismus noch nicht geklärt. Fest steht, dass das

Chaperon in seiner hexameren Form pro Untereinheit ein ATP mit der Walker A und -B Domäne bindet [67]. Zusätzlich ist das Nukleotid mit einer α -helikalen Sensordomäne derselben Untereinheit sowie mit einer der angrenzenden Untereinheit verbunden [67]. Die Ringstruktur der sechs Untereinheiten bildet einen zentralen Kanal, in den ein konservierter Loop (oft GYVG) von jeder Untereinheit ragt [67]. Angenommen wird, dass das Substrat mit den Loop im Kanal interagiert und durch deren auf- und ab-Bewegungen bei der ATP-Hydrolyse durch das Chaperon transportiert wird [68]. Dabei wird die Entfaltung und Translokation durch die Konformationsänderung des Loops katalysiert, der je nach Position eine verschieden starke Affinität zum Substrat hat und das Substrat somit durch den Kanal und die zentrale Pore zieht [68]. Neben dem GYVG-Motiv scheinen weitere Faktoren bei der Translokation und Entfaltung des Substrats eine Rolle zu spielen. So besitzen ClpA und ClpX weitere Loops, die auf verschiedenen Höhen des zentralen Kanals positioniert sind [69, 70] und ebenfalls an der Translokation des Substrats beteiligt sein können. Des Weiteren führt die ATP-Hydrolyse in FtsH und Hs1U nicht nur zu einer Bewegung des Loops, sondern zu großen Konformationsänderungen und der Rotation von ganzen Domänen [71, 72, 73]. Wie die einzelnen Faktoren bei der Entfaltung und Translokation zusammen wirken ist jedoch noch nicht geklärt.

1.2.6 Substraterkennung – kovalente Markierung und Adapterproteine

Die selektive Erkennung von Substraten stellt ein generelles Prinzip kontrollierter Proteolyse in Pro- und Eukaryoten dar. Proteinsubstrate besitzen dabei eine Reihe von Erkennungssequenzen, genannt Degrons [74, 75]. Diese Degrons können am Aminoterminal (N-Regel) oder im Inneren lokalisiert sein. Auch die kovalente Modifikation mit Erkennungspeptiden (z.B. *ssrA-Tag* am C-Terminus) ist möglich [76]. Neben den Degrons können Proteinsubstrate durch eine Gruppe von nicht miteinander verwandten Proteinen, den Adapterproteinen, reguliert werden, die mit dem Substrat und dem AAA⁺-Chaperon interagieren.

1.2.6.1 *SsrA-Tag*

Das *ssrA*-System unterstützt die Degradation von unvollständigen Proteinen, deren mRNA zerbrochen oder zerschnitten wurde [77]. Die Markierung für den Abbau erfolgt über die C-terminale Anheftung des Peptids AANDENYALAA, das kovalent mit dem Protein verknüpft wird [76, 77, 78]. Nach dem Model von Keiler *et al.*, 1996 erfolgt die kovalente Modifikation schon bei der Synthese eines Proteins ohne ein Stopp-Codon im richtigen Leserahmen. Ist ein Ribosom nicht in der Lage ein exprimiertes Protein zu entlassen, wird dies durch die *ssrA*-RNA (auch tmRNA) erkannt. Eine mit Alanin beladene *ssrA*-RNA bindet dann an das Ribosom, indem es eine tRNA nachahmt. Dadurch wird das schon synthetisierte Polypeptid auf die Alanyl-*ssrA*-RNA übertragen und es erfolgt die Synthese des AANDENYALAA-Polypeptids, was das Protein für den Abbau markiert.

1.1.1.1.N-End-Regel (N-end rule)

Nach der sogenannten N-End-Regel beeinflusst der N-terminale Aminosäurerest grundlegend die Halbwertszeit eines Proteins. In Eukaryoten kann eine bestimmte Aminosäureabfolge die Ubiquitinierung eines Proteins begünstigen (z.B. Arg, Lys, His) oder erschweren (z.B. Ala, Met, Pro) [79]. Auch in Prokaryoten beeinflussen bestimmte Aminosäuren am N-Terminus eines Proteins dessen Halbwertszeit. In *E. coli* wird die Erkennung von N-Degrone durch das Adapterprotein ClpS vermittelt. Bindet dieses an ClpA verändert sich die Substratspezifität weg von ssrA-Substraten hin zu N-End-Regel-Substraten [80, 81].

1.2.6.2 Adapterproteine

Adapterproteine bilden eine neue Klasse von Proteinen, die sich durch die Eigenschaft auszeichnen die Bindungsspezifität oder Aktivität von AAA⁺-Proteinen zu modulieren [66]. Die im Allgemeinen kleinen Proteine zeigen jedoch untereinander in Struktur oder Sequenz keine Verwandtschaft [66]. Ihre Effekte auf AAA⁺-Proteine werden durch die Interaktion mit dem Substrat und dem Chaperon ausgelöst. Für die Ausbildung eines Substrat-Adapterprotein-Chaperon-Komplexes sind zwei Mechanismen bekannt:

1. Das Adapterprotein bindet direkt an das Substrat und über eine weitere Domäne an das Chaperon. Durch die Ausbildung dieses ternären Komplexes kann das Substrat abgebaut werden.
2. Das Adapterprotein bindet an die Protease. Erst durch die Ausbildung dieses Komplexes können Substrate, wie z.B. ClpS, erkannt werden.

Zusätzlich zur Bindungsweise können Adapterproteine auch noch aufgrund ihrer Wirkungsweise unterschieden werden. So gibt es Adapterproteine, die die Kinetik der Substratbindung modulieren und solche die absolut notwendig für die Erkennung und Degradation des Substrates sind [66].

1.3 Oxygene Photosynthese

Die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie ist ein schon früh in der Evolution entstandener, bedeutender Prozess. Bei allen photosynthetisch aktiven Organismen sind die gleichen Grundprinzipien zu finden, jedoch unterscheidet man zwischen oxygener und anoxygener Photosynthese. Bei der durch Eukaryoten und Cyanobakterien betriebenen oxygenen Photosynthese wird aus Wasser molekularer Sauerstoff erzeugt. Bei der durch Bakterien betriebenen anoxygene Photosynthese, einem Relikt aus der sauerstofffreien Urzeit, können statt Sauerstoff andere anorganische Stoffe, wie z. B. Schwefel, entstehen.

Die oxygene Photosynthese besteht aus zwei gekoppelten Prozessen, die zur Fixierung von CO₂ führen. In einer ersten, lichtabhängigen Reaktion wird Wasser gespalten, wodurch

Reduktionsäquivalente und ATP gewonnen werden. In einem zweiten Schritt, der Dunkelreaktion, wird CO_2 gebunden und mithilfe von NADPH unter ATP-Verbrauch zu Kohlenhydraten reduziert.

Der oxygene Photosyntheseapparat ist in einem intracytoplasmatischen, zwiebelschalenartig angeordnetem Membransystem, den Thylakoiden (Abbildung 1.3 c), lokalisiert [82]. Die photochemischen Schlüsselreaktionen der Photosynthese erfolgen in drei multimeren, hintereinander geschalteten Proteinkomplexen, dem Photosystem II (PSII), dem Cytochrom- b_6 -Komplex und dem Photosystem I (PSI), die durch kleine, bewegliche Elektronencarrier (Chinon, Cytochrom c) miteinander verknüpft sind. Der vierte, für die Photosynthese wichtige Proteinkomplex, die ATPase, nutzt den durch den Elektronentransport und die Wasserspaltung entstandenen, elektrochemischen Gradienten über der Thylakoidmembran zur ATP-Synthese.

1.3.1 Phycobilisomen - die Lichtsammelkomplexe der Cyanobakterien

Um Lichtenergie für die Photosynthese verwenden zu können ist die effektive Absorption von Licht notwendig. Phototrophe Organismen sind deswegen mit speziellen Lichtsammelkomplexen ausgestattet, die die effektive Absorption von Licht gewährleisten.

Rotalgen und Cyanobakterien besitzen die sogenannten Phycobilisomen (PBS) als Lichtsammelkomplexe (auch Antennenkomplexe genannt). Dies sind große Multiproteinkomplexe aus verschiedenen Biliproteinen und Linkerpolypeptiden, die an der Stromaseite der Thylakoidmembran angelagert sind [83, 84, 85]. Ein PBS ist in der Regel mit zwei PSII assoziiert, wodurch absorbierte Energie an das spezielle Chlorophyll a (Chl a)-Paar des P680-Reaktionszentrums weitergeleitet werden kann [83, 86]. Da die PBS auf der Oberfläche der Thylakoide mobil sind, ist durch das Wandern derselben vom PSII zum PSI unter bestimmten Lichtbedingungen (wie z.B. Schwachlicht) eine Übertragung von Energie auf das PSI möglich [87, 88]. Strukturell können die PBS in verschiedene Typen unterschieden werden, wobei hier nur auf die am besten untersuchteste, hemidiscoidale Form eingegangen wird, die in den meisten Cyanobakterien vorkommt [89, 90, 91, 92, 93].

Die schematische Darstellung der hemidiscoidalen PBS in Abbildung 1.3 A zeigt deren Aufbau aus Kern und peripheren Stäbchen. Die Organisation des PBS-Kerns kann dabei bi-, tri- und pentazyklisch sein [92, 94, 95, 96, 97], wobei die den Kern bildenden Zylinder immer parallel zur Thylakoidmembran lokalisiert sind. Die sechs bis acht ebenfalls zylindrischen Stäbchen stehen senkrecht auf dem Kern.

Das PBS wird durch Phycobiliproteine (PBP) und Linkerpolypeptide gebildet. Alle PBP setzen sich dabei aus je einer α - und β -Untereinheit zusammen, die über Schleifen miteinander verbunden sind [98]. Beide Untereinheiten bestehen aus jeweils acht α -Helices und bilden als Heterodimer (auch $\alpha\beta$ -Monomer) die Grundstruktur der PBP. Drei dieser $\alpha\beta$ -Monomere bilden ein scheibenförmiges Trimer

$(\alpha\beta)_3$. Zwei Trimere bilden durch Kopf-an-Kopf-Aggregation ein Hexamer $(\alpha\beta)_6$ [93, 99]. Die Hexamere interagieren mit den Linkerproteinen. Diese nicht pigmentierten Polypeptide dienen zur Stabilisierung und Assemblierung durch Interaktion mit zwei PBP-Hexameren [100]. Zusätzlich haben sie einen großen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften der PBP und können sogar am Energietransfer beteiligt sein. So ist der große Linker L_{CM} , der den Allophycocyanin(APC)-Kern an der Membran verankert, für den Transfer der Anregungsenergie vom PBS zum Reaktionszentrum verantwortlich [94, 101].

Die PBP-Scheiben sind im PBS so angeordnet, dass es zu einem Fluss der absorbierten Energie von außen nach innen, hin zum speziellen Chl α -Paar kommen kann [102]. Außen liegt in vielen Cyanobakterien das hochenergetisch absorbierende Phycoerythrin (PE) (529-534 nm) bzw. Phycoerythrocyanin (PEC) (565-575 nm) oder Phycourobilin (Absorptionsmaxima 495 nm), gefolgt vom Phycocyanin (PC) (615-640 nm) im unteren Teil der Stäbchen. Die Stäbchen können jedoch auch nur von PC gebildet werden. Der Kern besteht aus dem niederenergetisch absorbierenden APC (650-670 nm), durch welches die Energie über verschiedene Chl α des Reaktionszentrums auf das spezielle Chl α -Paar übertragen wird (670 nm) [94, 103, 104].

Die Fähigkeit zur Absorption von Licht wird durch die Chromophoren (Phycobiline) der PBP ermöglicht. Diese sind durch konservierte Cysteinreste über Thioetherbindungen kovalent an das Apoprotein gebunden [98]. Die Phycobiline sind offenkettige Tetrapyrrole und verleihen den PBP die Fähigkeit Licht in einem Spektralbereich von 450 nm bis 660 nm zu absorbieren. In Cyanobakterien und Rotalgen wurden bislang vier verschiedene Biline gefunden, die sich durch Lage und Anzahl der Doppelbindungen unterscheiden und somit verschiedene Absorptionseigenschaften besitzen [105]. Die verschiedenen Absorptionseigenschaften der PBP werden durch das Binden unterschiedlicher Chromophore möglich. Jedoch hat neben der chemischen Struktur der prosthetischen Gruppe des PBP auch die Proteinumgebung einen wesentlichen Einfluss auf die Absorptionseigenschaften, sodass auch PBP mit der gleichen chromophoren Gruppe verschiedene Absorptionsmaxima besitzen können. Die verschiedenen Absorptionsmaxima der PBP sind als spezifische Farben für das Auge sichtbar. So erscheint PC blau, PE rot und APC blaugrün. Zusammen mit dem grün erscheinenden Chl α des Photosyntheseapparates entsteht die charakteristische blaugüne Färbung der Cyanobakterien.

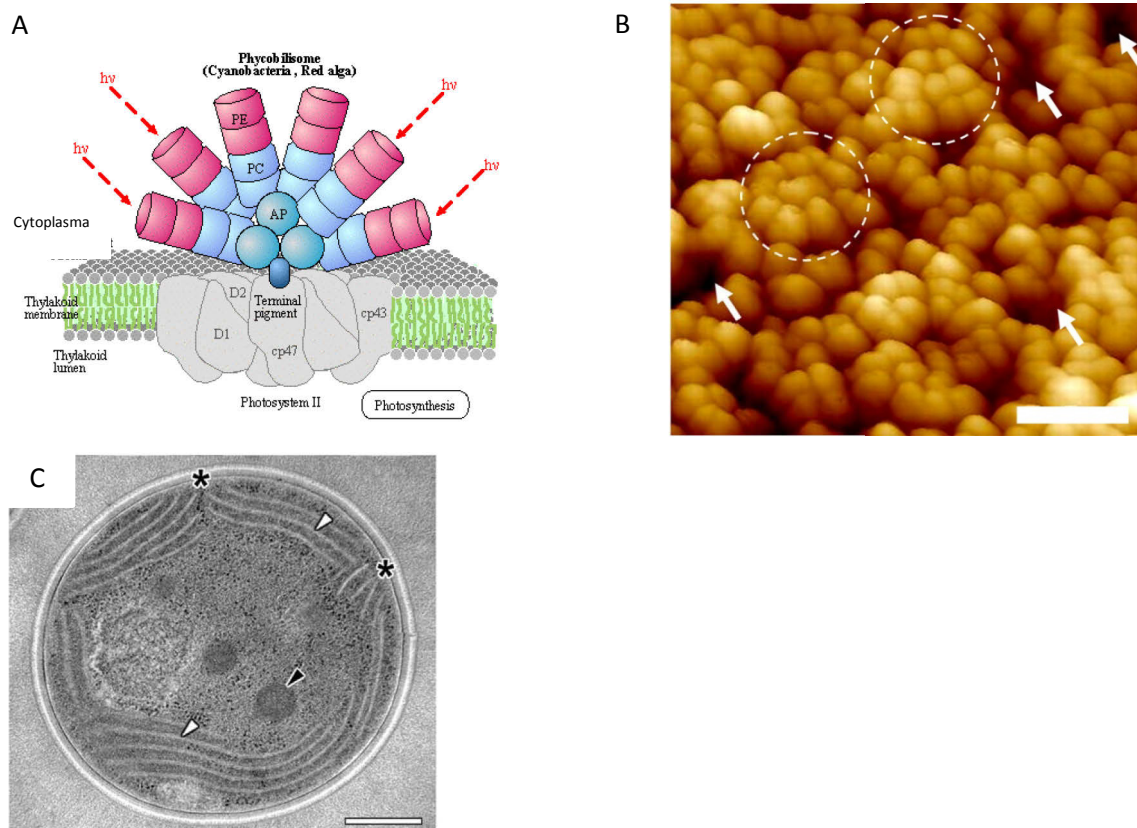


Abbildung 1.3: Architektur der PBS und Thylakoidmembranen. A: Schematische Darstellung der PBS. Gezeigt sind die Bestandteile der PBS mit Allophycocyanin (AP) im Zentrum über dem sich Phycocyanin (PC) und Phycoerythrin (PE) an der Peripherie befinden. Die Abbildung wurde der KEGG Pathway Database entnommen (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00196). B: Dreidimensionale Abbildung der PBS der unicellulären Rotalge *Porphyridium cruentum*, aufgenommen mittels *atomic-force*-Mikroskopie. PBS-Cluster sind durch Kreise markiert, PBS-freie Membranen durch Pfeile gekennzeichnet. C: Transmissionselektronenmikroskopieaufnahme von *Synechocystis* 6803. Die Thylakoidmembranen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet [106].

Viele Cyanobakterien sind durch gezielte Veränderung ihrer PBS in der Lage sich an unterschiedliche Lichtverhältnisse anzupassen. Dieser als chromatische Adaption oder Akklimation bezeichnete Prozess ermöglicht die bestmögliche Ausnutzung des Lichts bei minimierter Photooxidation durch zu viele absorbierte Photonen. So bilden Organismen, die zu einer chromatischen Adaption in der Lage sind im Rotlicht vermehrt blaues PC, wohingegen bei Grünlicht vermehrt rotes PE gebildet wird (Abbildung 1.3 A+B) [107, 108, 109]. Während der chromatischen Adaption wird neben der Synthese von PC und PE bzw. PEC auch die Linkersynthese reguliert [93, 110]. Der Umbau der PBS erfolgt durch die veränderte Expression der PBP bei verschiedenen Lichtbedingungen. Induziert durch Grünlicht konnte in *Fremyella diplosiphon* aber auch eine gezielte Proteolyse durch Expression des *nblA*-Gens (siehe nähere Erklärung zu *NblA* unter Abschnitt 1.5 und 1.5.1) nachgewiesen werden [111]. Für die chromatische Adaption sind Lichtrezeptoren notwendig, die eine Lichtveränderung registrieren können. In *Fremyella diplosiphon* sind zwei lichtabhängige Regulationssysteme für die chromatische Adaption verantwortlich, das *Rca*(*regulator for complementary chromatic adaptation*)-Sensorkinasesystem und das *Cgi*(*control of green light induction*)-System. Das *Rca*-System aktiviert

bei Rotlicht die Gene für die PC-Produktion, während es die Gene für Grünlicht absorbierendes PE reprimiert. Vermittelt wird dies durch die Sensorkinase der Phytochromklasse RcaE, die Rot- und Grünlicht detektiert. Je nach einfallendem Licht phosphoryliert (Rotlicht) und dephosphoryliert (Grünlicht) sie mit ihrer Histidinkinasedomäne die zwei Responseregulatoren RcaF und RcaC, die die jeweiligen Gene aktivieren oder deaktivieren [112]. Das Cgi-System hingegen kontrolliert nur Gene, die für die PE-Produktion entscheidend sind [113, 114, 115], eine genaue Charakterisierung des Systems steht jedoch noch aus.

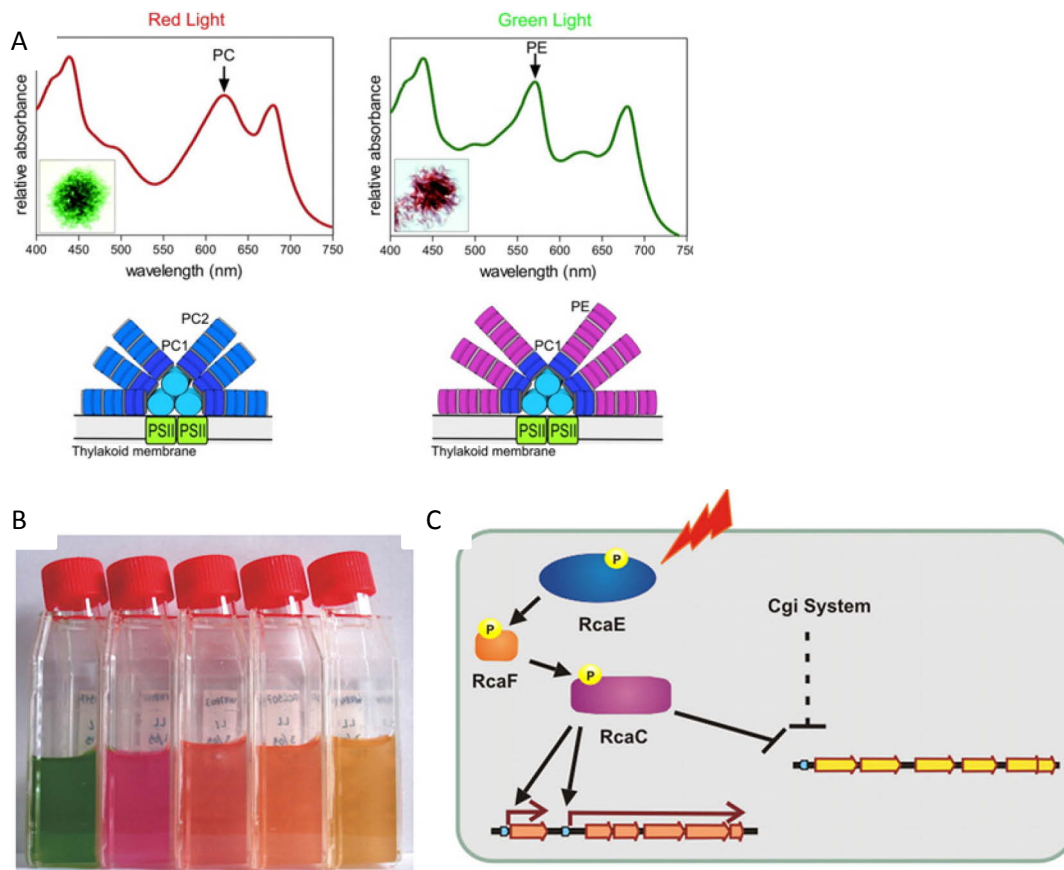


Abbildung 1.4. Chromatische Adaption. A: Absorptionsspektren ganzer Zellen von *Fremyella diplosiphon* in Rot- (links) und Grünlicht (rechts) [116]. B: Natürliche farbliche Diversität in verschiedenen Cyanobakterien durch Variation ihrer PBS-Zusammensetzung als Reaktion auf unterschiedliche Lichtbedingungen [117]. C: Regulationsmechanismus für die chromatische Adaption unter Rotlicht. Gezeigt ist die asymmetrische Regulation der Rotlicht-Gene (orange) und der Grünlicht-Gene (gelb) durch Rca und Cgi. Die gestrichelte Linie zeigt die angenommene Repression durch das Cgi-System, die gelben Kreise stellen die Phosphorylgruppen dar, die blauen Boxen die Bindestellen für RcaC.

1.3.2 Lichtreaktion

Die Reaktionskette der Photosynthese startet mit der Absorption eines Lichtquants in den Antennen des PSII, das von diesen hin zum speziellen Chlorophyllpaar (Chl *a*, Absorptionsmaximum 680 nm) im PSII geleitet wird. Das angeregte Pigment P₆₈₀ gibt ein Elektron an ein Mg-freies Chlorophyll, das Pheophytin, ab. Das dadurch oxidierte P₆₈₀ füllt seinen Elektronenbestand aus der Spaltung von Wasser an der Lumenseite der Membran wieder auf, während das Pheophytin das Elektron über mehrere gebundene Chinone auf Plastochinon überträgt. Plastochinon nimmt nacheinander zwei Elektronen und, zusätzlich aus dem Cytoplasma, zwei Protonen auf. Durch diese Reaktion findet eine

1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) und sind von einer einschichtigen Proteinhülle umschlossen [118]. Die RubisCO liegt in den Carboxysomen häufig in großen Mengen vor, da aufgrund ihrer geringen Wechselzahl eine hohe Konzentration des Enzyms für eine ausreichende CO_2 -Fixierung erforderlich ist. Die Separation der RubisCO in den Carboxysomen kann wiederum auf ihre Eigenschaft zurückgeführt werden neben CO_2 auch Sauerstoff als Substrat zu verwenden. Dabei ist das Verhältnis Carboxylase- zu Oxygenaseaktivität abhängig von der Konzentration der beiden gelösten Gase. Durch CO_2 -Konzentrierungsmechanismen (CCM) mittels CO_2 -Aufnahme in die Zelle und Umwandlung des anorganischen Kohlenstoffes in Bicarbonat [119, 120], wird die Konzentration von CO_2 in den Zellen erhöht. Das erhaltene Bicarbonat diffundiert in die Carboxysomen und wird dort durch die Carbonanhydrase wieder in CO_2 umgesetzt. Diese künstliche Erhöhung der CO_2 -Konzentration um das bis zu 1000-fache ermöglicht es das Gleichgewicht der Carboxylase- zu Oxygenaseaktivität der RubisCO hin zur CO_2 -Fixierung zu lenken und somit die Oxygenaseaktivität der RubisCO zu minimieren [119, 120].

Die RubisCO katalysiert in ihrer Carboxylase-Reaktion das Anfügen von CO_2 an die reaktive Endiolatform von Ribulose-1,5-bisphosphat. Der dadurch gebildete, instabile C6-Körper wird in zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat hydrolysiert und aus den Carboxysomen ins Cytoplasma geschleust. Hier finden alle weiteren Reaktionen des Calvin-Zyklus statt. In der 2. Phase des Pentose-Phosphat-Zyklus werden die beiden 3-Phosphoglycerat-Moleküle unter Beteiligung von ATP zu 1,3-Bisphosphoglycerat aktiviert und dann mithilfe von NADPH zu Glycerinaldehyd-3-phosphat reduziert. Die Triosephosphate werden im dritten Teil des Calvin-Zyklus durch Zuckerumwandlungsreaktionen zu Ribulose-5-phosphat umgesetzt (Pentosephosphatzzyklus). Ribulose-5-phosphat wird dann in einem letzten Schritt durch ATP wieder zum CO_2 -Akzeptor Ribulose-1,5-bisphosphat regeneriert. Wird der Zyklus dreimal ausgeführt, ist netto ein Molekül Triosephosphat entstanden, das für Biosynthesezwecke abgezweigt werden kann.

Zwei Triosephosphate können durch Reaktionen der Gluconeogenese zu Glukose und weiter zum Reservestoff Glykogen umgewandelt werden, oder durch Schritte der Glykolyse und des Tricarbonsäure-Zyklus (TCA-Zyklus) für andere Biosynthesen (z.B. Synthese von Aminosäuren) genutzt werden. Cyanobakterien fehlt jedoch das Enzym 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, weswegen bis vor kurzem angenommen wurde, dass der TCA-Zyklus in Cyanobakterien unvollständig ist [121]. Dabei wurde angenommen, dass der Glukosekatabolismus über den oxidativen Pentose-Phosphat-Zyklus (OOP) erfolgt [122, 123, 124, 125, 126]. Die kürzlich durch Zhang und Bryant identifizierten und charakterisierten Enzyme, die 2-Oxoglutarat zu Succinat umwandeln [127] schließen jedoch den Citratzyklus. Dabei wird 2-Oxoglutarat zuerst durch die 2-Oxoglutarat-Decarboxylase zu Succinyl-Semialdehyd decarboxyliert und dann durch die Succinyl-Semialdehyd-Dehydrogenase zu Succinat oxidiert. Der TCA-Zyklus unterscheidet sich somit vom konventionellen darin, dass kein Succinyl-CoA

als Intermediat gebildet wird, sondern Succinyl-Semialdehyd. Der Bedarf an Succinyl-CoA ist in Cyanobakterien jedoch minimal, da die Synthese der Pyrrolringe nicht wie in anderen Bakterien von Succinat und Glycin, sondern von Glutamat ausgeht [128]. Kürzlich wurden jedoch auch Gene der α - und β -Untereinheiten der Succinyl-CoA-Synthase in den Genomen von Cyanobakterien annotiert (genome.kazusa.or.jp), die vermutlich einen Nebenweg des TCA-Zyklus mit Succinyl-CoA als Endprodukt bilden (Abbildung 1.6).

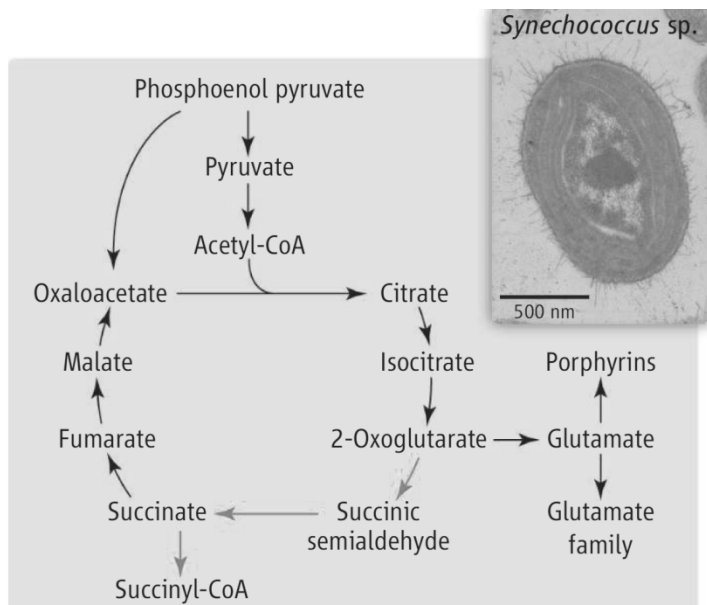


Abbildung 1.6: Der geschlossene TCA-Zyklus der Cyanobakterien [129]. Die roten Pfeile zeigen die bis vor kurzem unbekannten Reaktionen des TCA-Zyklus in Cyanobakterien.

1.4 Stickstoffassimilation

Cyanobakterien sind die effizientesten und abundantesten stickstofffixierenden Organismen in der Biosphäre, ihnen kommt daher eine große Bedeutung als Lieferant für gebundenen Stickstoff zu. Die meisten Cyanobakterien nutzen dabei Nitrat-, Nitrit- oder Ammoniumverbindungen als Stickstoffquelle.

Nitrat ist die häufigste Stickstoffquelle der Cyanobakterien und kommt mit weniger als 1 μM nur in geringen Konzentrationen in der Umwelt vor. Die Aufnahme erfolgt über ein hochaffines Nitrat- und Nitrit-ABC-Transportsystem [130, 131, 132]. Aufgenommenes Nitrat und Nitrit werden durch die Nitrat- und Nitrit-Reduktase zu Ammonium reduziert [133, 134], wobei in beiden Fällen reduziertes Ferredoxin aus der Photosynthese als Elektronendonator dient [135].

Die Aufnahme von Nitrat und Nitrit wird in Anwesenheit von Ammonium (NH_4^+) inhibiert (Ammoniumrepression [136]). Ammonium ist das bevorzugte Substrat, da es ohne Umwandlung direkt über den GS/GOGAT (Glutamin-Synthetase/Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase)-Weg zu Glutamat umgesetzt werden kann. Die Aufnahme von Ammonium erfolgt über hochaffine Ammonium/Methylammonium-Permeasen [137], während Ammoniak direkt in die Zelle

diffundieren kann. Die Form der Ammoniumaufnahme hängt vom pH-Wert der Umgebung ab, da dieser das Gleichgewicht zwischen der protonierten und nicht-protonierten Form bestimmt.

Aufgenommenes oder in der Zelle produziertes Ammonium wird in zwei Schritten über den GS/GOGAT-Weg zu Glutamat umgesetzt [138, 139, 140]. Zunächst katalysiert die Glutaminsynthetase die ATP-abhängige Übertragung von Ammonium auf Glutamat, wobei Glutamin entsteht. In einem zweiten Schritt, der durch die Glutamat-Synthase katalysiert wird, wird die Amidogruppe des Glutamins auf 2-Oxoglutarat übertragen, wobei zwei Moleküle Glutamat entstehen. Das gewonnene Glutamat ist der Stickstoffdonor für die Tetrapyrrol- und Aminosäurebiosynthese. Das verwendete 2-Oxoglutarat stammt aus dem Citratzyklus und stellt somit den Schnittpunkt zwischen Kohlenstoffkatabolismus und Stickstoffmetabolismus dar. Die Konzentration von 2-Oxoglutarat zeigt den Kohlenstoff- bzw. Stickstoffstatus in der Zelle an und hat direkten Einfluss auf die Regulation des Kohlenstoff- und Stickstoffstoffwechsels [141].

Neben der Verwendung von kombinierten Stickstoffverbindungen können einige Cyanobakterien auch molekularen Stickstoff fixieren. Die Schlüsselrolle bei der Stickstofffixierung übernimmt das Enzym Nitrogenase, das unter hohem Energieaufwand und der Verwendung von Reduktionsäquivalenten N_2 zu NH_3 reduziert. Die Nitrogenase wird durch Sauerstoff leicht inaktiviert, sodass das Enzym von molekularem Sauerstoff isoliert werden muss. Stickstofffixierende Cyanobakterien haben deswegen unterschiedliche Schutzmechanismen entwickelt um eine anaerobe Umgebung für das Protein zu schaffen. Einige Cyanobakterien wie *Cyanothece* sp. fixieren N_2 z.B. nur in der Dunkelheit, wenn die durch die Photosynthese bedingte Sauerstoffproduktion unterbrochen ist und der Sauerstoffpartialdruck zusätzlich durch die Atmung verringert wird [142]. In Symbiosen eingehenden Cyanobakterien wird die Nitrogenase häufig durch Schutzmechanismen des Wirtes von Sauerstoff abgeschirmt. Filamentbildende Cyanobakterien wie *Nostoc* 7120 hingegen differenzieren Heterozysten aus, in denen der molekulare Stickstoff fixiert wird [8]. Die vergrößerten Zellen mit dicker Zellwand sind in regelmäßigen Abständen im Filament zu finden. Durch ein nicht aktives PSII in den Heterozysten sowie die geringe Sauerstoffdurchlässigkeit der Zellwände herrscht in ihnen ein mikroaerobes Klima, welches die Nitrogenase vor der Inaktivierung schützt [143, 144, 145].

1.4.1 Koordination des Stickstoff- und Kohlenstoffstoffwechsels

Die Aufnahme und Assimilation von Stickstoff unterliegt der strikten Regulation und ist abhängig von der Verfügbarkeit einer Stickstoff- und Kohlenstoffquelle. Die zentralen Regulatorproteine, die für die Balance zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffwechsel verantwortlich sind, sind dabei das P_{II} -Protein und der Transkriptionsfaktor NtcA.

Das Homotrimer P_{II} ist ein Signaltransduktionsprotein, dessen Phosphorylierungsstatus von der Konzentration seiner Effektoren abhängt. P_{II} ist in der Lage ADP, ATP und 2-Oxoglutarat zu binden

[141] , wobei die je drei Bindungsstellen der Effektoren sich gegenseitig positiv oder negativ beeinflussen [146] . Herrscht Stickstoffmangel, bindet 2-Oxoglutarat in Synergie mit ATP an das P_{II} -Protein [147] . Durch diese Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung, die eine maximale Phosphorylierung ermöglicht. Liegt das P_{II} -Protein bei geringer 2-Oxoglutaratkonzentration ohne den Effektor vor, wird es dephosphoryliert. Je nach Phosphorylierungsstatus des Proteins bindet das Regulatorprotein an verschiedene Rezeptormoleküle und beeinflusst so deren Aktivität oder Transkription.

Die Kontrolle der Transkription erfolgt durch den globalen Stickstoffregulator NtcA (*nitrogen transcription control*). Das NtcA-Homodimer besteht aus einer N-terminalen Sensordomäne und einem C-terminalem DNA-bindenden Helix-Turn-Helix-Motiv [148, 149] . Über eine palindrome Konsensussequenz bindet der Transkriptionsfaktor an die DNA und agiert als Aktivator oder Repressor. NtcA aktiviert die Transkription der Nitratassimilationsgene (Autoregulation) [134, 150] sowie die eigene Expression [134, 151, 152] . Auch einige Gene des Calvin-Zyklus und der Photosynthese besitzen in ihrer Promotorregion ein NtcA-Bindemotiv [153, 154, 155, 156] . Des Weiteren stehen Gene für die gezielte Chlorose in Cyanobakterien (Abschnitt 1.5) und einige Gene der Heterozystendifferenzierung in diazotrophen Cyanobakterien (Abschnitt 1.5) unter der Kontrolle von NtcA.

Der molekulare Mechanismus der NtcA-Aktivierung ist noch ungeklärt, jedoch konnte ein Einfluss durch 2-Oxoglutarat, P_{II} und PipX gezeigt werden. PipX ist ein kleines Protein, das mit P_{II} und NtcA interagiert. Dabei zeigen *in vitro*-Daten, dass es an P_{II} bei einer geringen und an NtcA bei einer hohen 2-Oxoglutaratkonzentration bindet [157] . An NtcA gebundenes PipX spielt scheinbar eine Rolle als Coaktivator, da es für die Aktivierung einiger NtcA-abhängiger Gene bei Stickstoffmangel essentiell ist.

1.5 Anpassung an Nährstoffmangel

Cyanobakterien besitzen zahlreiche Mechanismen für die Adaption an Nährstoffmangel. Tritt der Mangel eines wichtigen Elements wie z.B. Schwefel, Eisen, Kupfer oder Stickstoff auf, wird dies als „Hunger“ wahrgenommen. Als Folge versucht sich der Organismus an die Stresssituation anzupassen. Spezifisch auf den Mangel eines bestimmten Nährstoffes abgestimmt, kommt es zu einer Reaktion, die dem Mangel entgegenwirken soll. Dabei treten einige Reaktionen im Allgemeinen bei Nährstoffmangel auf, wohingegen andere spezifisch für den Mangel eines bestimmten Nährstoffes sind. So ist die Expression von Nährstofftransportern (wie z.B. eines Sulfattransporters unter sulfatlimitierenden Bedingungen [158, 159]) oder die Synthese von Enzymen, die den Transport von Substraten in die Zelle erleichtern (z. B. der periplasmatischen alkalischen Phosphatase unter phosphatlimitierenden Bedingungen [160, 161]), als typische, spezifische Antwort auf eine

Mangelsituation zu betrachten. Eine weitere augenfällige, spezifische Antwort auf Nährstoffmangel ist die Veränderung der Zellmorphologie. So erfolgt unter Stickstoffmangel in diazotrophen, filamentösen Cyanobakterien wie *Nostoc* 7120 die Differenzierung von Heterozysten.

Ausgelöst wird die Heterozystendifferenzierung durch eine hohe 2-Oxoglutaratkonzentration unter Stickstoffmangelbedingungen. 2-Oxoglutarat bindet an NtcA, das so als Aktivator für Gene der Heterozystendifferenzierung fungiert [162]. Initiiert wird die Differenzierung einer einzelnen Zelle zu einer Heterozyste durch die Konzentration von HetR (*heterocyst differentiation control protein*) und NtcA. Zunächst wird die Transkription von *hetR* durch NtcA aktiviert, HetR wiederum beeinflusst die Transkription von *ntcA* positiv. Die so entstehende gegenseitige, positive Verstärkung der Transkription führt zu einem sich erhöhenden Konzentrationslevel beider Proteine in den Zellen [152]. Ist eine gewisse Konzentration erreicht, kommt es zur Differenzierung der Heterozyste [163, 164]. Dabei ist zu beobachten, dass sich zunächst ein ganzes Cluster von Zellen bis zu einem gewissen Punkt differenziert, sich dann aber nur eine der Zellen zu einer reifen Heterozyste entwickelt [165]. Dies ist durch die Produktion von PatS zu erklären: das 13-17 Aminosäuren lange Polypeptid wird von einer sich differenzierenden Heterozysten gebildet und hindert die Nachbarzellen daran sich ebenfalls zu differenzieren [166]. So bildet sich nur die schnellste Zelle in einem Zellcluster zur Heterozyste aus. Zusätzlich produziert die sich bildende Heterozyste PatA, das der Inhibition von PatS entgegenwirkt [167, 168]. Nach 18-24 Stunden hat sich eine reife Heterozyste mit verdickter Zellwand geformt, die N_2 unter mikroaeroben Bedingungen fixiert. Im Filament kommt es zum Transport von Stickstoff in die vegetativen Zellen und von Kohlenstoffverbindungen in die Heterozysten.

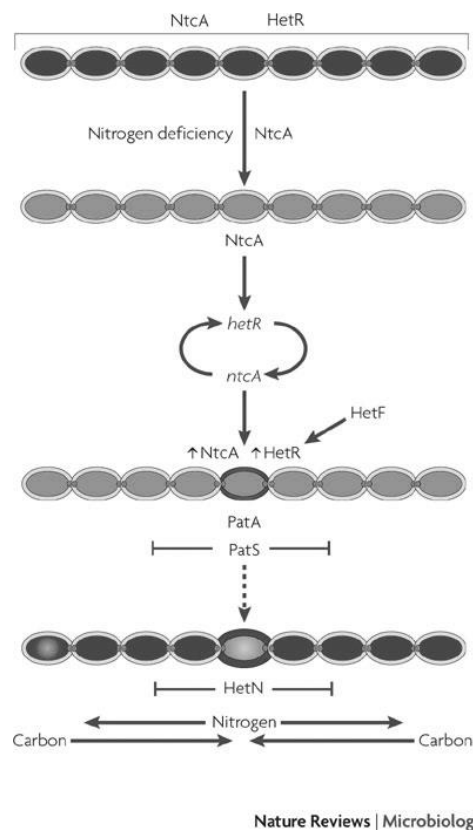


Abbildung 1.7: Heterozystendifferenzierung in einem filamentösen Cyanobakterium. Das Schema repräsentiert das Filament eines Heterozystenbildenden Cyanobakteriums. Unter Stickstoffmangel kommt es durch NtcA zur Expression von HetR. Durch positive Autoregulation von *hetR* und *ntcA* kommt es dann schließlich zur Differenzierung einer Heterozyste. [169].

Die Verlangsamung der anabolen Reaktionen der Zelle und die Synthese von interzellulären Reservestoffen wie Cyanophycin, Glykogen oder Poly- β -hydroxybutyrat [170, 171], treten als Reaktion auf verschiedene Nährstoffbedingungen auf, sodass man sie als generelle Antwort auf den Nährstoffmangel der Zellen betrachten kann. Ein weiterer genereller Mechanismus ist die Anpassung des Photosyntheseapparats, um, bei durch Nährstoffmangel verlangsamten zellulären Metabolismus, unter gleichbleibend hoher Lichtintensität, oxidativem Stress entgegenzuwirken [172]. Der als Chlorose bekannte Prozess (Allen & Smith, 1969) bezeichnet die verminderte Neusynthese und die schnelle Degradation der PBS und des Chl *a* aus den Reaktionszentren. Durch diesen Abbau verändert sich die Färbung der Cyanobakterien von blau-grün nach gelb-grün. Der Verlauf des Pigmentabbaus ist abhängig von Temperatur, CO_2 -Verfügbarkeit und Lichtintensität (Barker-Astrom et al., 2005; Collier & Grossman, 1992; Görl et al., 1998) und variiert je nach Nährstoff. Da die PBS bis zu 40 % des Zellproteins ausmachen, stellen sie ein großes Reservoir an Aminosäuren und Stickstoff dar, sodass ihr Abbau neben der Vermeidung von Schäden auch dringend benötigte Ressourcen für die Anpassung an Stressbedingungen zur Verfügung stellt.

Ein vollständiger Abbau der PBS ist bei Stickstoffmangel und in einigen Organismen wie *Synechococcus* 7942 bei Schwefelmangel zu beobachten [173]. Der Mangel an Phosphat, anorganischem Kohlenstoff oder Eisen führt hingegen nur zu einem partiellen Verlust der PBS [95,

173, 174, 175] . Die Chlorose der Zellen ist bei einzelligen, nicht stickstofffixierenden Arten wie *Synechocystis* 6803 und *Synechococcus* 7942 am auffälligsten, die ihre PBS innerhalb der ersten 24-48 Stunden abbauen [173, 175] . Bei weiterem Mangel an gebundenen Stickstoff in ihrer Umgebung treten sie in ein Ruhestadium mit stark reduziertem Stoffwechsel ein [176, 177] . Auch in filamentösen, stickstofffixierenden Arten wie *Nostoc* 7120 kommt es in den ersten Stunden nach Entzug von gebundenem Stickstoff zu einem Abbau der PBS im Filament. Jedoch manifestiert sich der Abbau nur in den Heterozysten, während die PBS in den vegetativen Zellen wieder aufgebaut werden.

1.5.1 Mechanismus des PBS-Abbaus

Die Degradation der PBS ist ein geordneter Prozess. Er beginnt an den peripheren Stäbchen mit dem Abbau endständiger Hexamere und Linkerproteine (*trimming*) und endet unter anhaltenden Mangelbedingungen mit dem Abbau des APC-Kerns (*core degradation*) [173] . Eine Ausnahme von diesem Modell scheint nach neusten Erkenntnissen der PBS-Abbau in Heterozysten zu sein. Ke und Haselkorn untersuchten Filamente von *Nostoc* 7120 mittels Einzel-Zell-Fluoreszenzmessungen nach dem Entzug von Stickstoff aus dem Medium. Dabei konnte in Zellclustern, in denen es zu einer Induktion der Heterozystendifferenzierung kam, ein Verlust des Energietransfers zwischen APC und PSII bei vorhandenem Energietransfer zwischen PC und APC beobachtet werden. Ke und Haselkorn vermuten deswegen für frühe Heterozysten eine Degradation der PBS vom Kern hin zu den Antennen, ausgelöst durch die Dephosphorylierung des Linkers zwischen APC und PSII [178] . In vegetativen Zellen scheint jedoch der von Grossman *et al.* postulierte Abbau von den Antennen zum Kern hin zu erfolgen [178] .

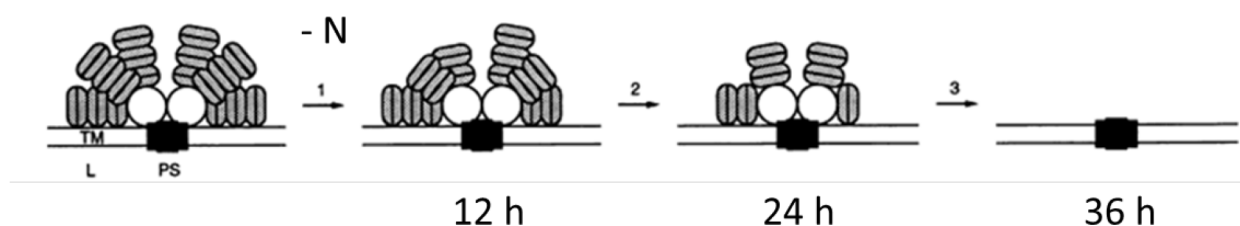


Abbildung 1.8: Abbau der PBS unter Nährstoff-limitierenden Bedingungen. Gezeigt sind die PBS verbunden mit der Thylakoidmembran. -N: Entzug von kombiniertem Stickstoff, 12, 24 und 36 L=Lumen, TM=Thylakoidmembran, PS=Photosystem II.

Durch chemische *random*-Mutagenese in *Synechococcus* 7942 konnten Collier und Grossman im Jahr 1994 Mutanten identifizieren, die nach Entzug von Schwefel bzw. Stickstoff aus dem Medium keine Chlorose mehr zeigten. Komplementationsuntersuchungen ergaben, dass die Inaktivierung eines kleinen Gens zu diesem drastischen Phänotyp führte. Das Gen wurde nach seinem nicht bleichenden (*non bleaching*) Phänotyp als *nbIA*-Gen bezeichnet. In den folgenden Jahren konnten mit *nbIB* [179] ,

nbIC [180] , *nbIR* [181] und *nbIS* [182] weitere Gene identifiziert werden, deren Inaktivierung zu einem nicht bleichendem Phänotyp führte.

Das *nbIB*-Gen kodiert für ein Polypeptid, das Homologien zu einer PC-Lyase aufweist (Dolganov & Grossman, 1999). Die Billin-Lyase vermittelt die korrekte Bindung des Chromophors Phycocyanobilin an das Apoprotein, es wird deshalb vermutet das NblB die umgekehrte Reaktion katalysiert und so das Chromophor vom PBP löst. Die Gene *nbIC*, *nbIR* und *nbIS* sind regulatorische Komponenten, die für die Induktion der Expression des *nbIA*-Gens unter Mangelbedingungen notwendig sind [180, 181, 182, 183] . NblR weist Homologien zu Responseregulatoren der OmpR-Familie auf [181] , NblS ist eine Sensor-Histidin-Kinase [182] und NblC besitzt Homologien zu eubakteriellen Anti-Sigmafaktoren [180] . An der positiven Regulation der Transkription von *nbIA* unter Stickstoffmangel sind zusätzlich zu NblR und NblC auch, wie schon unter Abschnitt 1.4.1 beschrieben, NtcA und PipX beteiligt. Neben der positiven Regulation ist auch eine negative Regulation durch NblS im Zusammenspiel mit SipA und dem Responseregulator RpaB möglich [184, 185, 186] .

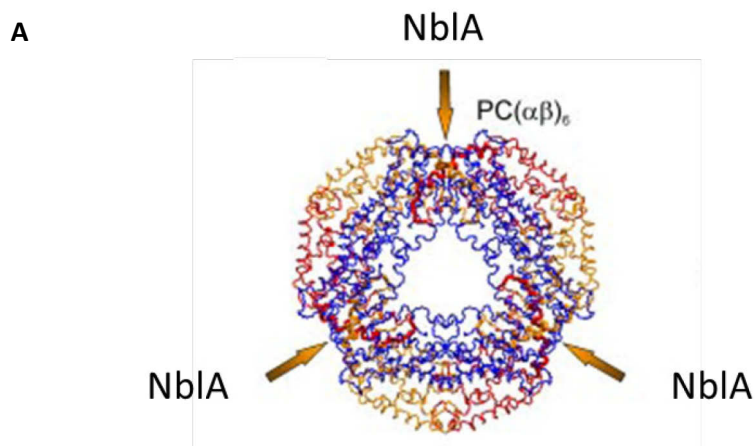
Das *nbIA*-Gen kodiert für ein kleines Polypeptid, dessen Homologe in fast allen PBS-besitzenden Cyanobakterien und Rotalgen zu finden sind [187] . Die Induktion des NblA-Proteins unterscheidet sich jedoch in den verschiedenen Organismen. So wird die Transkription des *nbIA*-Gens in *Synechococcus* 7942 z.B. durch Mangel an Stickstoff, Sulfat und in einem geringeren Maß durch Phosphatmangel induziert [188] . In *Synechocystis* 6803 ist die Expression hingegen nur unter Stickstoffmangel nachweisbar [189] . Auch die Stärke der Transkription des *nbIA*-Gens unterscheidet sich. In nicht diazotrophen Organismen wie *Synechococcus* 7942 und *Synechocystis* 6803 kommt es unter Nährstoffmangel zu einer 50-fach erhöhten Akkumulation des *nbIA*-Transkripts [175, 188, 189, 190] und zu einem vollständigen Abbau der PBS. In diazotrophen Organismen wie *Nostoc* 7120 hingegen steigt das Transkriptniveau des *nbIA*-Gens nur um das Fünffache an [191] und der vollständige PBS-Abbau erfolgt, wie beschrieben, lediglich in den Heterozysten.

Um die Funktion von NblA im PBS-Abbau aufzuklären, wurde die Struktur des NblA-Proteins in den Cyanobakterien *Nostoc* 7120 [192] , *Synechococcus* 7942 [193] und *Thermosynechococcus vulcanus* [193] untersucht. Alle drei kristallisierten NblA-Proteine zeigten ein α -Helix-Loop- α -Helix-Motiv, mit einer kürzeren N-terminalen und einer längeren C-terminalen Helix. Die zwei Helices sind dabei v-förmig, über einen 37° Winkel antiparallel zueinander angeordnet. Zwei Monomere bilden die biologisch aktive Form, das Dimer, wobei sich deren Spitzen auf derselben Seite überlagern und Teile der C-terminalen Helices miteinander über elektrostatische Wechselwirkungen interagieren. Ein erster Hinweis für die Funktion von NblA wurde 2003 erbracht. In *Tolypothrix* sp PCC7601 konnte eine Interaktion zwischen NblA, PC und PEC gezeigt werden [194] . 2006 wurde dann für das NblA-Protein aus *Nostoc* 7120, neben der Interaktion von NblA mit den Stäbchen der PBS, auch eine Interaktion mit APC gezeigt. Als Bindestelle der PBP wurden die konservierte Aminosäurereste Leu51

und Lys53 nahe des C-Terminus des NblA-Proteins identifiziert [192] . Durch einen Peptid-Blot-Assay konnten außerdem die Bindestellen von NblA₇₁₂₀ im PC und PEC bestimmt werden. So zeigte das NblA-Protein eine Interaktion mit der Y- und A-Helix beider PBP. Die Bindung von NblA an die PBS erfolgt demnach über die konservierten Aminosäuren nahe des C-Terminus, an die α -Untereinheiten von PC. Da α -PC in der Mitte des PC- bzw. PEC-Hexamers lokalisiert ist, bindet NblA im Zwischenraum zweier Trimere eines Hexamers, wodurch drei Bindestellen pro Hexamer möglich sind (Abbildung 1.9 A).

Auch am N-Terminus der NblA-Proteine befindet sich eine konservierte Aminosäuresequenz, die nicht für die Bildung des Dimeres verantwortlich ist und deren Mutation zu einem Funktionsverlust des Proteins führt. Durch Reinigung von NblA im Komplex mit ClpC aus dem löslichen Extrakt von *Nostoc 7120* konnte 2008 das HSP100-Chaperon als Interaktionspartner von NblA identifiziert werden. *In vitro*-Interaktionsstudien mit gereinigtem NblA, PBP und ClpC bekräftigten das Ergebnis. Als Bindeort für NblA im ClpC-Hexamer wurde die N-Domäne des Chaperons identifiziert, wobei pro Untereinheit ein NblA-Protein gebunden wird [187, 195] .

Durch diese Ergebnisse konnte durch Karradt *et al.* ein Modell für den PBS-Abbau in *Nostoc 7120* erstellt werden. Demzufolge agiert NblA als Adapterprotein, das als Linker simultan an die PBS und ClpC, den Chaperonpartner einer Clp-Protease, bindet (Abbildung 1.9) und diese dadurch in räumliche Nähe zueinander bringt. Die Ausbildung des ternären Proteinkomplexes führt dann zum Abbau der PBS durch die Clp-Protease ([187] Karradt, 2009).



B

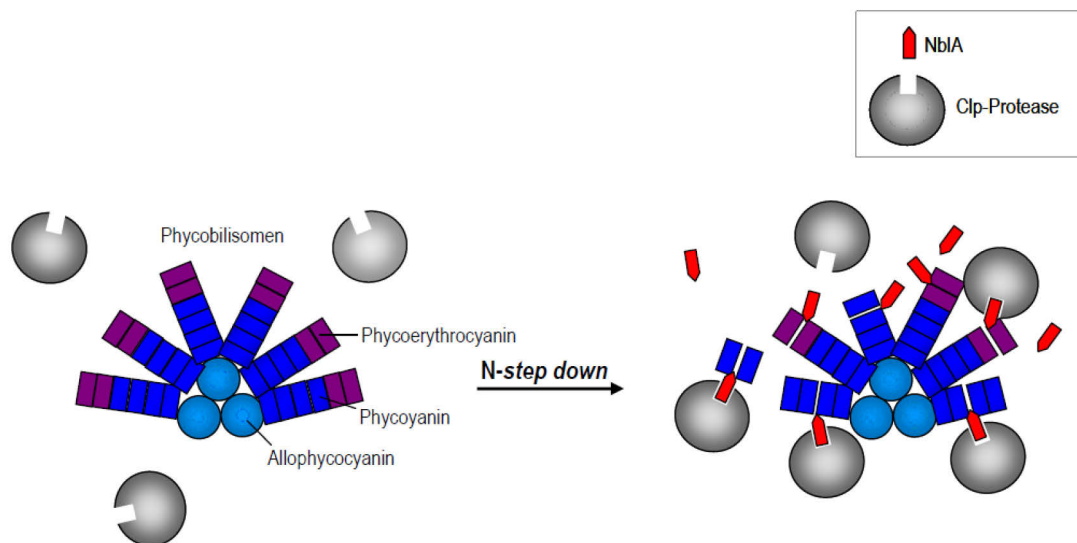


Abbildung 1.9: NblA interagiert mit den PBS und ClpC. A: Das NblA-Dimer bindet über die Aminosäuren L51 und K53 an die α -Untereinheiten des Phycocyanin-Hexamers (α -Untereinheiten: rot und gold; β -Untereinheiten: blau). B: Bei Wachstum in stickstoffhaltigem Medium ist NblA nicht oder in nur sehr geringer Menge in den Zellen vorhanden. Die konstitutiv exprimierte Clp-Protease bindet nicht an die PBP, sie werden nicht als Substrate erkannt (links). Werden die Zellen in stickstofffreies Medium überführt (N-step-down), wird die Expression von NblA induziert (rechts). NblA bindet simultan an die PBP und ClpC, den Chaperon-Partner einer Clp-Protease, und bringt diese dadurch in räumliche Nähe zueinander. Die Ausbildung des ternären Proteinkomplexes führt zum Abbau der Phycobiliproteine durch die Clp-Protease [195].

1.6 Ziel der Arbeit

In Cyanobakterien führt ein Mangel an gebundenem Stickstoff zu einem Differenzierungsprozess, der sogenannten Chlorose. In diesem streng regulierten Prozess wirken, neben den Reaktionen der generellen Stressantwort, das nbl-System sowie das nährstoffspezifische NtcA-Regulon.

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass in dem filamentösen Cyanobakterium *Nostoc* 7120 eine Interaktion von NblA mit ClpC und den PBS zum PBS-Abbau führt. Dabei konnte *in vitro* gezeigt werden, dass NblA gleichzeitig als eine Art Linker mit den PBS und ClpC interagiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass NblA als Adapterprotein die Substratspezifität einer Clp-Protease, die ClpC als Chaperonpartner aufweist, moduliert und die PBS in Anwesenheit von NblA abgebaut werden. Geht man davon aus, dass NblA den Abbau der PBS durch Interaktion mit dem Substrat und der Protease vermittelt, kann man es in die Gruppe der Adapterproteine einordnen. Adapterproteine sind eine Gruppe nicht verwandter Proteine, die durch die Bindung an eine Protease die Diversität der Substraterkennung in prokaryotischen Systemen erhöhen können (siehe auch Abschnitt 1.2.6.2). Einige Adapterproteine werden zusammen mit dem Substrat abgebaut, wohingegen andere nur durch Interaktion mit der Protease deren Substratspezifität modulieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deswegen die Frage untersucht, ob NblA zusammen mit dem PBS abgebaut wird und durch seine Expression und Degradation reguliert werden kann, oder ob es für den Stopp des PBS-Abbaus eines weiteren Regulationsmechanismus bedarf.

In Cyanobakterien ist die Adaptation an Stickstoff sehr divers. So zeigen diazotrophe, filamentöse Cyanobakterien wie *Nostoc* 7120 in den ersten Stunden nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium einen Abbau der PBS in allen Zellen. Jedoch kommt es nach der Differenzierung in vorläufige Heterozysten und vegetativen Zellen (siehe auch Abschnitt 1.5) nur in den Heterozysten zu einem vollständigen Abbau, wohingegen sie in den vegetativen Zellen wieder aufgebaut werden. Nicht diazotrophe Stämme bauen bei anhaltendem Stickstoffentzug hingegen ihre gesamten PBS ab und gehen in ein Dauerstadium über. Trotz dieser unterschiedlichen Adaptionsmechanismen scheint der Abbau der PBS in Cyanobakterien durch Homologe des NblA-Proteins induziert zu sein [175, 188, 189, 194]. Jedoch ist nicht klar, ob der in *Nostoc* 7120 gefundene Mechanismus zum Abbau von PBS auch auf andere Cyanobakterien übertragbar ist. Im Mittelpunkt des Interesses dieser Arbeit stand deswegen die Untersuchung des PBS-Abbaus in dem unicellulären, nicht diazotrophen Organismus *Synechocystis* 6803. Schon im Vorfeld war bekannt, dass *Synechocystis* 6803 zwei essenzielle NblA-Proteine besitzt, deren Deletion zu einem nicht bleichenden Phänotyp der Bakterien führt. Dabei war jedoch nicht klar, ob die NblA-Proteine miteinander interagieren müssen um den Abbau der PBS zu induzieren. Des Weiteren scheint die Funktion von NblA, die in *Nostoc* 7120 von einem Protein übernommen wird, in *Synechocystis* 6803 auf zwei Proteine verteilt zu sein. Die Untersuchung des Mechanismus in *Synechocystis* 6803 könnte demnach mehr Aufschluss über die genaue Funktionsweise des PBS-Abbaus geben. Des Weiteren sollte durch die Expression einer rekombinanten Clp-Protease die am PBS-Abbau beteiligte Protease identifiziert und der Abbau im Detail untersucht werden.

2. Ergebnisse

Seit der Entdeckung des NblA-Proteins 1994 durch Collier und Grossman, konnte dessen Funktion beim Abbau der PBS Stück für Stück aufgeklärt werden. Am besten untersucht ist das NblA-Protein aus dem filamentösen Cyanobakterium *Nostoc* 7120. Neben der Struktur von NblA konnten mit den PBS und ClpC zwei Bindungspartner identifiziert werden (siehe Einleitung 1.5.1). Wird NblA exprimiert, bindet es gleichzeitig an beide Interaktionspartner und dient als „Verbindungsstück“ zwischen ihnen [187, 192, 195]. Es wird angenommen, dass durch die Ausbildung dieses trimeren Komplexes ClpC die PBS als Substrat erkennt und diese durch eine Clp-Protease abgebaut werden. NblA ist dabei als Adapter zwischen den beiden Proteinen essenziell, ist kein NblA vorhanden oder kann NblA nicht mit ClpC bzw. den PBS interagieren, werden diese nicht abgebaut [187, 192]. Auf Transkriptebeine ist NblA, wie schon in der Einleitung unter Punkt 1.5.1 erläutert, durch NtcA streng reguliert. Eine Regulation auf Proteinebene ist bis jetzt nicht bekannt. Ein denkbarer Mechanismus zur Regulation der NblA-Konzentration ist der Abbau von NblA gemeinsam mit den PBS durch die Clp-Protease. Dies hätte zur Folge, dass ein Stopp der NblA-Expression als Regulation genügt, da noch vorhandenes NblA gemeinsam mit den PBS durch die Clp-Protease abgebaut werden würde.

Die These eines gemeinsamen Abbaus von PBS und NblA wurde im ersten Abschnitt dieser Arbeit durch *in vivo* Versuche in *Nostoc* 7120 untersucht.

2.1 NblA₇₁₂₀ ein Adapterprotein des Chaperons ClpC

2.1.1 Konstruktion von NblA-GFP Varianten

Um einen Einblick in die Funktionsweise von NblA zu erhalten, sollte die Expression des Proteins nach der Fusion mit GFP in lebenden Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Dafür wurde NblA₇₁₂₀ C-terminal mit GFP fusioniert, da im Vorfeld der Arbeit eine Fusion von NblA₇₁₂₀ mit einem ähnlich großen C-terminalen Glutathion-S-Transferase(GST)-Tag keine Funktionsbeeinträchtigung des Proteins gezeigt hatte [187]. Das GFP-Fusionsprotein wurde *in trans* in der *nblA*-defizienten ($\Delta nblA$) *Nostoc* 7120-Mutante [187] exprimiert. Schon im Vorfeld der Arbeit wurde gezeigt, dass der Phänotyp dieser Insertions-Deletions-Mutante durch Expression eines funktionsfähigen NblA₇₁₂₀-Proteins komplementiert werden kann [191]. Um zu untersuchen, ob NblA₇₁₂₀ vermittelt durch ClpC₇₁₂₀ abgebaut wird, wurde neben dem Wildtyp-NblA₇₁₂₀ eine NblA₇₁₂₀-Variante mit einem Aminosäureaustausch in der ClpC₇₁₂₀-Bindestelle (NblA₇₁₂₀(L7A) C-terminal mit GFP fusioniert. Durch die Mutation von Leucin zu Alanin konnte keine Interaktion von NblA₇₁₂₀ mit ClpC₇₁₂₀ erfolgen [187]. Ist der NblA₇₁₂₀-Abbau durch ClpC₇₁₂₀ vermittelt, sollte sich die NblA₇₁₂₀-Konzentration durch die gestörte Interaktion in der Mutante erhöhen. Da die Mutation eines Proteins immer einen Einfluss auf die Sekundärstruktur und die biologisch aktive Form des Proteins haben kann, wurde zusätzlich

die Struktur von NblA₇₁₂₀(L7A) überprüft. Dabei konnte eine dem NblA₇₁₂₀ entsprechende Sekundärstruktur durch CD-Spektren (Abbildung im Anhang, A1) belegt werden. Die Fähigkeit von NblA(L7A) *in vitro* ein biologisch aktives Dimer auszubilden wurde schon im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt [195].

Die Expression der Proteine *in trans* erfolgte von dem mobilisierbaren, sich autonom replizierenden Shuttle-Vektor pRL1049. In diesen wurde schon im Vorfeld dieser Arbeit die kodierende DNA-Sequenz des *nblA*₇₁₂₀-Gens inklusive eigener Promotor- und Terminatorsequenzen kloniert (pRL#nblA, [187]). Durch gerichtete Mutagenese erfolgte das Einfügen einer *NdeI*-Schnittstelle vor dem Stoppcodon des *nblA*₇₁₂₀-Gens, über welche *gfp* in den Vektor eingebracht wurde (Abbildung 2.1A). Die Mutation in der ClpC₇₁₂₀-Bindestelle des NblA₇₁₂₀-Proteins wurde durch eine weitere gerichtete Mutagenese erreicht, bei der das codierende Basentriplett für die konservierte Aminosäure Leucin-7 gegen Alanin ausgetauscht wurde (pRL#nblA₇₁₂₀ (L7A)-*gfp*). Die resultierenden Plasmide wurden über konjugativen Transfer in die $\Delta nblA$ -Mutante eingebracht.

Zur Überprüfung der Expression und Funktionalität der NblA₇₁₂₀-Fusionsproteine wurden die selektierten Exkonjuganten in stickstofffreies Medium überführt, Absorptionsspektren ganzer Zellen im Bereich von 400-650 nm aufgenommen und der, durch die NblA₇₁₂₀-Expression induzierte, PBS-Abbau durch Veränderungen des PC-Peaks bei ~625 nm verfolgt.

In Abbildung 2.1 B sind die Absorptionsspektren der Mutanten nach Anzucht in Standardkulturmedium (+N) und nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff (48 h –N) aus dem Medium dargestellt. Die Abnahme der PC-Absorption im Bereich von 620-630 nm nach 48 Stunden unter Stickstoffmangelbedingungen zeigt, dass eine vollständige Komplementation des nicht bleichenden Phänotyps der $\Delta nblA$ -Mutante durch die Expression von NblA₇₁₂₀-GFP erfolgte. Die Expression von NblA₇₁₂₀(L7A)-GFP konnte hingegen den Wildtyp-Phänotyp, wie erwartet, nicht komplementieren, erkennbar an der sich nahezu nicht verändernden Amplitude des PC-Absorptionsmaximums bei ~625 nm.

Der Abbau der PBS kann nicht nur durch eine Veränderung der Absorption bei ~625 nm detektiert werden, sondern ist auch unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Durch Anregung mit Licht im Wellenlängenbereich von 575-585 nm kann die rot erscheinende Fluoreszenz der PBP beobachtet und so auch deren Abnahme verfolgt werden. Nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium ist deshalb in allen vegetativen Zellen eine schwächere Fluoreszenz erkennbar, die den Abbau der PBS widerspiegelt. Der PBS-Abbau bei filamentösen, diazotrophen Cyanobakterien manifestiert sich dabei nach ca. 24-48 Stunden hauptsächlich in den Heterozysten, die zum Schutz der sauerstoffempfindlichen Nitrogenase keine oxygene Photosynthese betreiben (siehe auch Abschnitt 1.5), während die vegetativen Zellen ihre PBS wieder aufbauen. Somit erscheinen reife

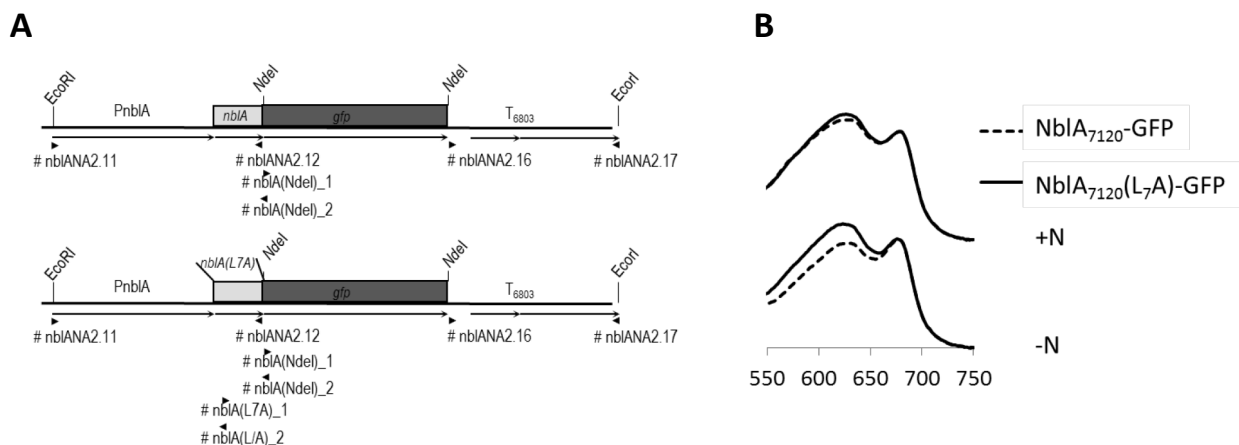
Heterozysten bei Anregung mit entsprechendem Licht (Rhodamin-Filter-Set-Extinktion: 555/28 Emission: 617/73) im Gegensatz zu den sie umgebenden vegetativen Zellen dunkel.

Abbildung 2.1 D zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der beschriebenen Mutanten nach 24 und 48 Stunden unter Stickstoffmangel. Die Aufnahmen zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Mutanten. Betrachtet man die roten Zellfäden, kann man in der NblA₇₁₂₀-GFP-Mutante eine deutlich schwächere PBS-Fluoreszenz in den Heterozysten als in den umgebenden vegetativen Zellen erkennen. Indes sind in der NblA₇₁₂₀(L7A)-GFP-Mutante keine solchen Unterschiede in der PBS-Fluoreszenz zwischen vegetativen Zellen und Heterozysten (durch Pfeile markiert) zu erkennen.

Der Vergleich der Mutanten zeigt, dass die C-terminale Fusion von GFP mit NblA nicht zu einem Verlust der Proteinfunktionalität führt, sondern auf dem gezielte Austausch der konservierten Aminosäure Lysin in der ClpC₇₁₂₀-Bindestelle zurückzuführen ist.

2.1.2 Analyse der Expression von NblA₇₁₂₀

Um den Effekt der fehlenden Interaktion von ClpC₇₁₂₀ mit NblA₇₁₂₀ zu analysieren wurde die Expression von NblA₇₁₂₀-GFP und NblA₇₁₂₀(L7A)-GFP nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium untersucht. Dafür wurde NblA₇₁₂₀-GFP bzw. NblA₇₁₂₀(L7A)-GFP in löslichem Zellextrakt durch einen Immunoblot nachgewiesen, oder die Expression und Lokalisation der Fusionsproteine in lebenden Zellen mithilfe von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen verfolgt.



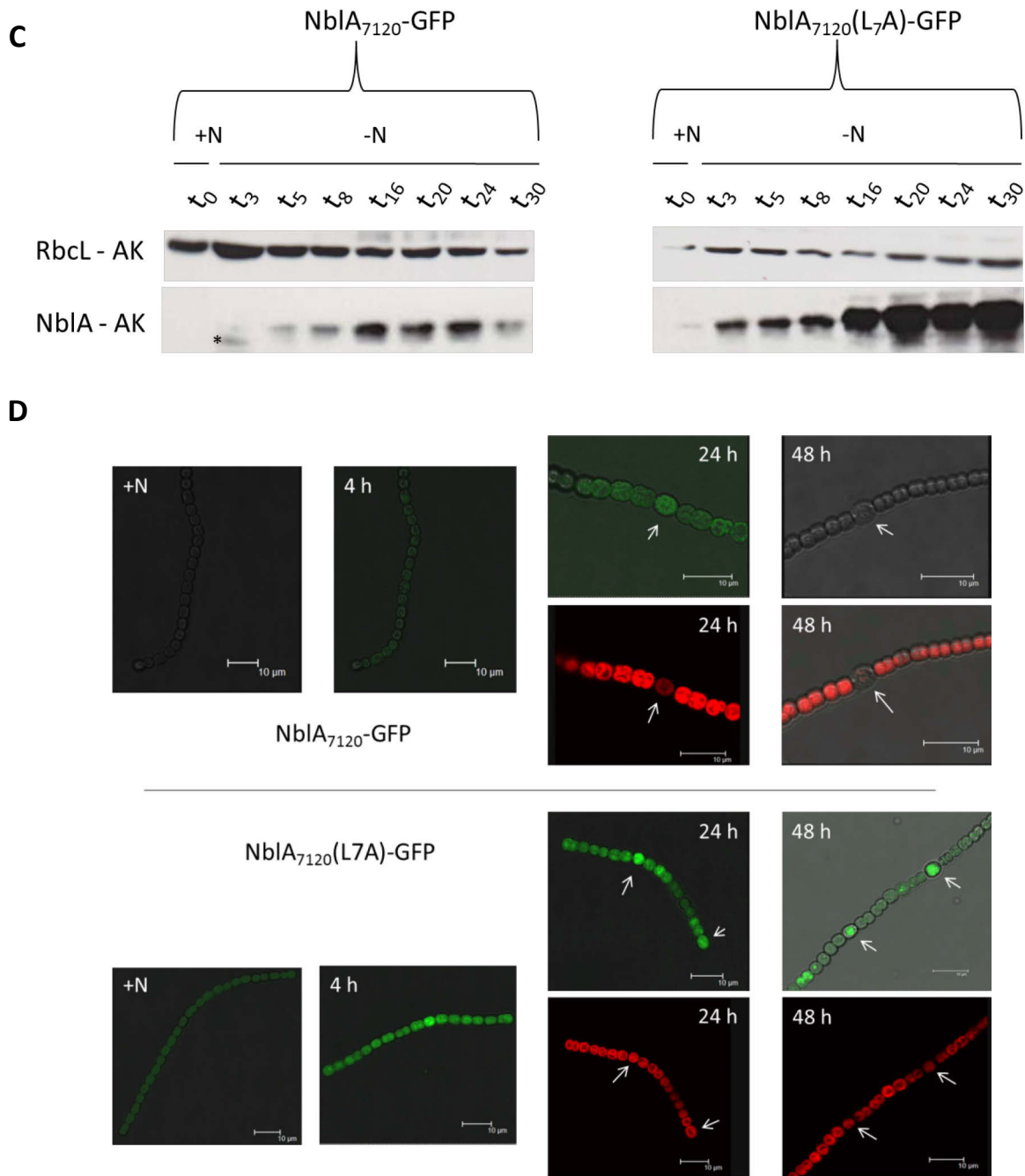


Abbildung 2.1 Analyse der Expression der NbIA₇₁₂₀-Fluorophor-Fusionsproteine NbIA₇₁₂₀-GFP und NbIA₇₁₂₀(L7A)-GFP exprimiert *in trans* in der $\Delta nbIA$ -Mutante von *Nostoc* 7120 nach dem Entzug von Stickstoff aus dem Medium.

A: Schematische Darstellung der Konstrukte für die Expression von NbIA₇₁₂₀-GFP *in trans* in *Nostoc* 7120. Die verwendeten Primer sind unterhalb der Abbildungen dargestellt und die für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sind im Gen markiert. **B:** Absorptionsspektren ganzer Zellen bei Wachstum in Standardkulturmedium (+N) und 48 Stunden nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium. Die Absorptionsspektren wurden auf die optische Dichte bei 750 nm und das Absorptionsmaximum des Chl *a* bei 680 nm normiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Absorptionsspektren der +N-Kulturen entlang der Ordinate verschoben. **C:** Immunoblot der NbIA₇₁₂₀-Fluorophor-Fusionsproteine. Die zu den Zeitpunkten 0, 3, 5, 8, 16, 20, 24 und 30 Stunden nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium gesammelten Zellen der Mutanten NbIA₇₁₂₀-GFP und NbIA₇₁₂₀(L7A)-GFP wurden in Na/K-Phosphatpuffer (pH 7,6) aufgenommen und mittels Glasperlen aufgeschlossen. Die Immunodetektion der NbIA₇₁₂₀-Proteine erfolgte im, pro Spur auf 2,5 μ g Chl *a* eingestellten, löslichen Teil des Zellextraktes. Die mittels einer SDS-PAGE separierten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und NbIA₇₁₂₀ mit einem NbIA₇₁₂₀-Antikörper detektiert. **D:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der NbIA₇₁₂₀-GFP und der NbIA₇₁₂₀(L7A)-GFP $\Delta nbIA$ -Mutanten von *Nostoc* 7120 beim Wachstum in Standardkulturmedium (+N) sowie 4, 24 und 48 Stunden nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium. Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des konfokalen Laserscanmikroskops (Leica) durch Anregung bei 488 nm, die Detektion erfolgte im Wellenlängenbereich von 500-540 nm. Um die Zellfäden besser darstellen zu können, wurden gleichzeitig Durchlichtaufnahmen der Zellen angefertigt und diese mit den

Fluoreszenzaufnahmen fusioniert (LCS Lite, Leica). Zusätzlich ist nach 24 und 48 Stunden die rot erscheinende Fluoreszenz der PBS durch Anregung mittels Rhodamin-Filter-Set bei 555/28 nm und Detektion im Wellenlängenbereich zwischen 617-673 dargestellt. Die nach 24 bzw. 48 Stunden entstandenen Heterozysten sind mit Pfeilen markiert.

Abbildung 2.1 C zeigt die Ergebnisse des Immunoblots. Für diesen wurden Zellen der NbIA₇₁₂₀-GFP- und NbIA₇₁₂₀(L7A)-GFP-Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten, nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium geerntet, aufgeschlossen und die auf 2,5 µg eingestellten, löslichen Zellextrakte auf ein SDS-Gel aufgetragen. Im Anschluss wurden die durch die SDS-PAGE separierten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mithilfe des NbIA₇₁₂₀-Antikörpers das NbIA₇₁₂₀-GFP-Protein (Abbildung 2.1 C links) und das NbIA₇₁₂₀(L7A)-GFP-Protein (Abbildung 2.1 C rechts) detektiert. Die darüber dargestellten Banden zeigen die Ladekontrolle, für den die obere Hälfte der Nitrocellulosemembran gegen die große RubisCO-Untereinheit (RbcL) immunisiert wurde (Anti-RbcL). Die Signale indizieren, dass zu allen Zeitpunkten eine ähnliche Menge an löslichem Zellextrakt aufgetragen wurde. Betrachtet man die Expression von NbIA₇₁₂₀-GFP über die Zeit erkennt man eine Zunahme des NbIA₇₁₂₀-GFP-Proteins innerhalb der ersten 16 Stunden nach Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium. Danach bleibt das Proteinlevel bis 24 Stunden unter Stickstoffmangelbedingungen gleich und nimmt nach 30 Stunden wieder ab. Beim Vergleich mit der Proteinkonzentration der NbIA₇₁₂₀(L7A)-GFP-Variante ist ein deutlicher Unterschied feststellbar. Hier ist schon vor dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium eine schwache Bande zu erkennen, die nach 3 Stunden deutlich ausgeprägt ist, in den weiteren Stunden um ein Vielfaches ansteigt und auch noch nach 30 Stunden weiter zunimmt.

Die in Abbildung 2.1 D dargestellten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen ähnliche Ergebnisse. Hierbei wurde die Expression und Lokalisation der NbIA₇₁₂₀-GFP-Varianten fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht. Die Kulturen wurden vor- und zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Stickstoffentzug untersucht. Dabei wurde sich die Eigenschaft von GFP zu Nutze gemacht, bei Anregung mit blauem oder ultravioletttem Licht grün zu fluoreszieren. Dafür wurde GFP mit einer Wellenlänge von 490 nm angeregt und die Fluoreszenz der Proteine in einem Wellenlängenbereich von 500-540 nm detektiert. Um die Konturen der Zellfäden besser sichtbar zu machen, wurden die Fäden zusätzlich im Durchlicht fotografiert und die entstandenen Bilder mithilfe der Software LCS Lite (Leica) übereinandergelegt.

In den gezeigten Bildern der Exkonjuganten, die NbIA₇₁₂₀-GFP exprimieren, erkennt man eine Zunahme der grünen Fluoreszenz in den ersten 24 Stunden nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium. Auffällig ist dabei, dass nach einer anfänglich gleichmäßigen Verteilung des Fusionsproteins auf den gesamten Zellfaden, nach 24 Stunden ein gehäuftes Vorkommen in den Heterozysten (mit Pfeil markiert) zu erkennen ist und nach 48 Stunden keine grüne Fluoreszenz mehr detektiert werden kann. Diese Ergebnisse decken sich mit den im Immunoblot gewonnenen Erkenntnissen, nach denen die Menge an Fusionsprotein 24 Stunden nach dem Entzug von

gebundenem Stickstoff wieder abnimmt. Bei NblA₇₁₂₀(L7A)-GFP hingegen kann man unter Stickstoffmangelbedingungen grundsätzlich eine deutlich höhere Menge an grüner Fluoreszenz erkennen. Auch hier kommt es nach anfänglich gleichmäßiger Lokalisation des NblA₇₁₂₀(L7A)-Proteins in allen Zellen zu einem gehäuften Vorkommen in den Heterozysten. Nach 24 Stunden ist jedoch auch noch eine hohe Konzentration des Proteins in den vegetativen Zellen zu erkennen, die erst nach 48 Stunden in die Heterozysten verlagert zu sein scheint. Auffällig sind hier die nach 48 Stunden auftretenden, hell leuchtenden, grünen Einschlüsse in den vegetativen Zellen.

Der Immunoblot und die Fluoreszenzaufnahmen zeigen, dass durch die Mutation der ClpC₇₁₂₀-Bindestelle das NblA₇₁₂₀(L7A)-GFP-Protein in deutlich höherer Konzentration vorliegt, als bei der Expression von NblA₇₁₂₀-GFP. Die Mutation der Bindestelle führt demnach zu einer Akkumulation von NblA₇₁₂₀, das durch die fehlende Interaktion mit ClpC₇₁₂₀ nicht mehr abgebaut werden kann. Die Versuche bestärken die Annahme, dass NblA₇₁₂₀ als Adapterprotein von ClpC₇₁₂₀ fungiert und durch eine Clp-Protease abgebaut wird.

2.2 Ist der NblA-induzierte PBS-Abbau ein universelles System?

Nachdem für *Nostoc* 7120 das System des PBS-Abbaus in seinen Grundzügen aufgeklärt werden konnte, stellt sich die Frage, ob das Modell des PBS-Abbaus auch auf andere Cyanobakterien übertragbar ist. Hinweise darauf liefern Ergebnisse anderer Gruppen. So konnten Dines und Mitarbeiter eine Komplementation der *nblA*-defizienten-Mutante aus *Synechococcus* 7942 durch die Expression von NblA₇₁₂₀ zeigen. Auch die Struktur der kristallisierten NblA-Proteine [192, 193] ist trotz der geringen Aminosäuresequenzähnlichkeit sehr ähnlich und die PBS- und ClpC-Bindestellen im NblA-Protein sind stark konserviert. Der Abbau der PBS durch das Adapterprotein NblA könnte demnach ein auf andere NblA besitzenden Cyanobakterien übertragbarer Mechanismus sein.

Um diese These zu überprüfen wurde mithilfe von *in vitro*-Bindungsstudien die Interaktion von NblA₇₁₂₀ mit ClpC-Proteinen aus verschiedenen Organismen untersucht. Sollte die Interaktion von NblA und ClpC auch in anderen Cyanobakterien erfolgen, könnte NblA₇₁₂₀ auch an homologe ClpC-Proteine binden.

2.2.1 NblA₇₁₂₀ interagiert mit homologen ClpC-Proteinen

Die Untersuchung der Interaktion von NblA₇₁₂₀ mit orthologen ClpC-Proteinen erfolgte durch sogenannte *in vitro*-pulldown-Versuche. Das Prinzip des *in vitro*-pulldown entspricht methodisch der Affinitätschromatografie. Dabei wird ein Protein mit einem Affinitäts-Tag fusioniert und durch Inkubation mit einer entsprechenden Affinitätsmatrix an dieser immobilisiert. Gibt man potentielle Interaktionspartner zu, können diese an das immobilisierte Protein binden. Nicht gebundene Proteine werden durch mehrere Waschschriffe entfernt. Nach Elution der gebundenen Proteine, werden diese mithilfe einer SDS-PAGE analysiert und so gebundene Interaktionspartner identifiziert.

In dem folgenden Versuch wurden rekombinant erzeugte, gereinigte Proteine eingesetzt. Dafür wurde NblA₇₁₂₀ mit C-terminalem GST-Tag heterolog in *E. coli* exprimiert, wohingegen die Expression von ClpC₇₁₂₀ und ClpC₇₉₄₂ unter Verwendung des Expressionsvektors pGEX-6P-BSE mit N-terminalem GST-Tag erfolgte. Hier erlaubte es die zwischen GST-Tag und Protein vorhandene PreScission®-Protease-Schnittstelle den GST-Tag nach der Reinigung der Proteine zu entfernen. ClpC₆₈₀₃ wurde unter Verwendung des Expressionsvektors pET22b mit N-terminalem His-Tag exprimiert. Die für die Expression in *E. coli* verwendeten Plasmide sind in Abbildung 2.2 A dargestellt.

Zunächst wurde NblA₇₁₂₀ je nach Ansatz mit einem rekombinant erzeugten ClpC-Protein (*Nostoc* 7120, *Synechococcus* 7942 oder *Synechocystis* 6803) inkubiert. Die biologisch aktive Form von ClpC, das Hexamer, wurde durch Zugabe von Mg-ATP gewährleistet (siehe Einleitung Abschnitt 1.2.5). Um nachzuweisen, dass die Interaktion zwischen NblA₇₁₂₀ und ClpC spezifisch ist, wurde je Kombination zusätzlich ein Ansatz ohne ATP mitgeführt. Im Anschluss wurde NblA₇₁₂₀-GST durch das Zufügen von Glutathion-Agarose immobilisiert und nicht an die Matrix gebundene bzw. nicht mit NblA₇₁₂₀-GST interagierende Proteine durch mehrere Waschschrte entfernt. Die Elution der an der Matrix verbliebenden Proteine erfolgte mit glutathionhaltigem Elutionspuffer.

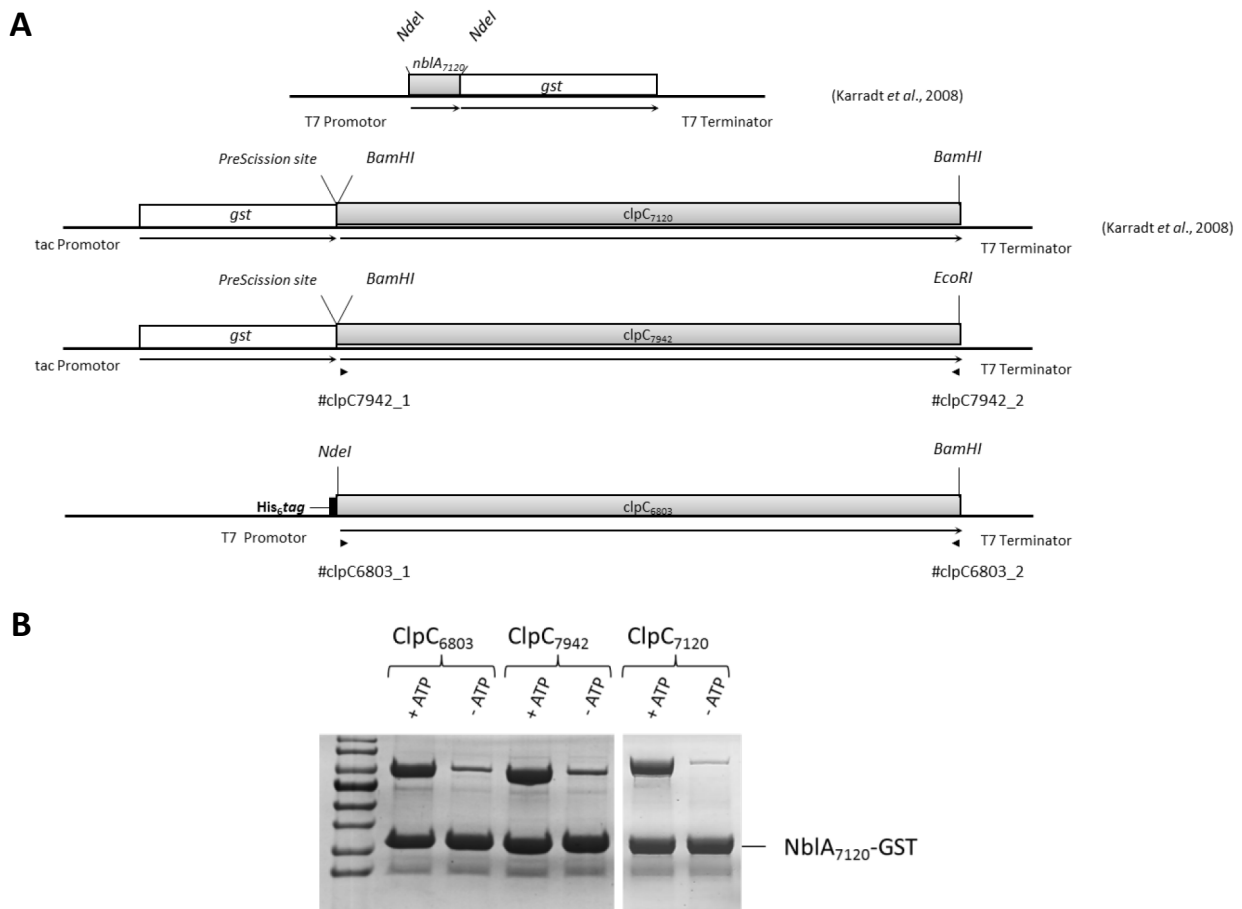


Abbildung 2.2: Interaktionsanalyse von NblA₇₁₂₀ mit ClpC-Proteinen aus verschiedenen Organismen. A: Schematische Darstellung der Konstrukte zur Expression von NblA₇₁₂₀-GST und GST-ClpC₇₁₂₀, GST-ClpC₇₉₄₂ bzw. His-ClpC₆₈₀₃. Die Lage der für die Konstruktion eingesetzten Primer ist mit Pfeilen markiert und die im Rahmen der Klonierung verwendeten

Restriktionsorte sind gekennzeichnet. **B:** *In vitro-pulldown*-Analysen. Das NblA₇₁₂₀-GST Fusionsprotein wurde mit ClpC₇₁₂₀, ClpC₇₉₄₂ oder His-ClpC₆₈₀₃ in An- oder Abwesenheit von 5 mM ATP in Na/K-Phosphatpuffer (pH 7,6) inkubiert. Nach Bindung an Glutathion-Agarose wurden nicht gebundene Proteine durch mehrere Waschschrte entfernt und gebundene Proteine mit glutathionhaltigem Elutionspuffer eluiert. Die eluierten Proteine wurden durch eine DOC/TCA-Fällung konzentriert, mittels SDS-PAGE separiert und mit Coomassie angefärbt.

Abbildung 2.2 zeigt die Ergebnisse der *in vitro-pulldown*-Versuche. In Anwesenheit von Mg-ATP (+ATP) war eine Interaktion aller ClpC-Proteine mit NblA₇₁₂₀-GST nachweisbar. Wurden die Proteine hingegen ohne Mg-ATP (-ATP) inkubiert, waren nur sehr geringe Mengen ClpC im Eluat enthalten. Folglich interagieren alle drei ClpC-Homologe spezifisch und nur in ihrer biologisch aktiven Form, dem Hexamer, mit NblA₇₁₂₀-GST.

Daraus kann man schlussfolgern, dass *in vitro* eine Interaktion zwischen NblA₇₁₂₀ und ClpC-Homologen möglich ist. Die Ergebnisse bestätigen demnach die schon beschriebenen Komplementationsanalysen durch Dines und Kollegen [193].

2.3 *Synechocystis* 6803- ein Sonderfall?

Die bis jetzt beschriebenen Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass man den in *Nostoc* 7120 entdeckten Mechanismus des durch NblA-induzierten PBS-Abbaus auch auf andere Cyanobakterien übertragen kann. Eine Ausnahme, mit einem möglicherweise komplexeren Mechanismus, könnte *Synechocystis* 6803 darstellen. Dieses nicht diazotrophe Cyanobakterium besitzt zwei NblA-Proteine (NblA1 und NblA2), die beide für den PBS-Abbau essentiell sind [189]. Über die Funktionsweise, die biologisch aktive Form und mögliche Interaktionspartner ist bislang jedoch nichts bekannt ist.

Um näheres über den Mechanismus des PBS-Abbaus in *Synechocystis* 6803 zu erfahren, wurde im nun folgenden Abschnitt die biologisch aktiven Formen von NblA1 und NblA2 durch *in vivo* und *in vitro*-Versuche näher untersucht.

2.3.1 Kann NblA₇₁₂₀ den nicht bleichenden Phänotyp der *nblA1*- und *nblA2*-defizienten Doppelmutante aus *Synechocystis* 6803 komplementieren

In einem ersten Versuch sollte geklärt werden, ob die Funktionsweise von NblA1 und NblA2 der von *Nostoc* 7120 gleicht. Zu diesem Zweck wurde NblA₇₁₂₀ unter der Kontrolle des *nblA1/nblA2* Promotors und Terminators [189] *in trans* in der $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante von *Synechocystis* 6803 auf dem sich selbstständig replizierenden pVZ-Vektor [196] exprimiert (Abbildung 2.3 A) und untersucht ob NblA₇₁₂₀ den nicht bleichenden Phänotyp dieser Mutante komplementieren kann. Die Expression von NblA₇₁₂₀ wurde durch den Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium induziert und der Abbau der PBS über die Aufnahme von Absorptionsspektren dokumentiert. Dafür wurden Spektren ganzer Zellen unter Standardkulturbedingungen sowie 48 Stunden nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium aufgenommen.

Die Absorptionsspektren in Standardkulturmedium (Abbildung 2.3 B (+N)) zeigen, dass die untersuchte Exkonjugante, der Wildtyp und die $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante hinsichtlich ihres PBS-Gehaltes keine Unterschiede aufwiesen. Entzog man den Stickstoff aus dem Medium, konnte nur bei der Deletionsmutante kein PBS-Abbau nachgewiesen werden. Im Wildtyp kam es innerhalb von 48 Stunden zu einem Abbau eines Großteils der PBS (Abbildung 2.3 B (-N)). Ein sogar noch stärkerer PBS-Abbau konnte bei der Expression von NblA₇₁₂₀ beobachtet werden, sichtbar an der Abnahme der Amplitude des PC-Peaks. Dieser verstärkte Abbau ist auch bei der Komplementation durch Expression von NblA1 und NblA2 zu beobachten (nicht gezeigt) und kann durch die erhöhte Kopienzahl des sich selbst replizierenden pVZ-Vektors in den Zellen erklärt werden.

Vergleicht man die Absorptionsspektren von *Synechocystis* 6803 mit den Absorptionsspektren von *Nostoc* 7120 (Abbildung 2.1 B), wird hier auch der schon beschriebene Unterschied zwischen diazotrophen und nicht diazotrophen Cyanobakterien deutlich (siehe Einleitung Abschnitt 1.5). Während *Nostoc* 7120 nur einen Teil seiner PBS abbaut, kommt es in den nicht stickstofffixierenden *Synechocystis* 6803-Zellen zu einem fast vollständigen Abbau derselben.

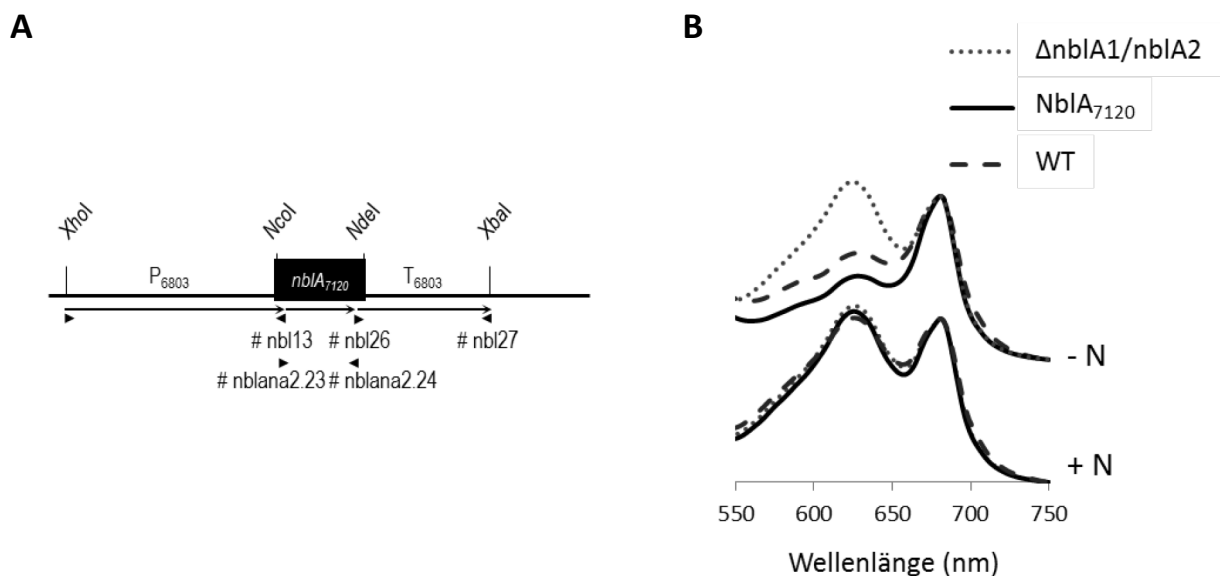


Abbildung 2.3: Komplementation der $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante von *Synechocystis* 6803 durch NblA₇₁₂₀. **A:** Schematische Darstellung des Konstrukts zur Komplementation der $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante. Die Lage der verwendeten Primer ist unter der Abbildung angegeben und die Restriktionsorte sind im Gen markiert. **B:** Absorptionsspektren ganzer Zellen beim Wachstum in Standardkulturmedium (+N) und 48 Stunden nach dem Entzug von Stickstoff aus dem Medium (-N). Die Absorptionsspektren 48 Stunden nach Stickstoffentzug sind aus Gründen der Übersichtlichkeit entlang der Ordinate verschoben und alle Absorptionsspektren sind auf die optische Dichte bei 750 nm und das Absorptionsmaximum des Chl *a* bei 680 nm normiert.

Die Komplementationsversuche zeigen, dass die Expression von NblA₇₁₂₀ in *Synechocystis* 6803 die Inaktivierung der chromosomalen *nblA1*- und *nblA2*-Gene aufhebt. Demnach vermittelt auch in *Synechocystis* 6803 NblA den Abbau der PBS. Jedoch stellt sich die Frage, wieso *Synechocystis* 6803 zwei NblA-Proteine besitzt und welche biologisch aktive Form diese aufweisen.

2.4 NblA1 und NblA2 Homo- oder Heterodimer?

Aus anderen Cyanobakterien ist bekannt, dass die Ausbildung eines Dimeres essentiell für die Proteinfunktion von NblA ist [192, 193]. Die Bildung eines bzw. zweier Dimere ist demnach auch in *Synechocystis* 6803 wahrscheinlich. Doch übernehmen NblA1 und NblA2 jeweils als Homodimere verschiedene Funktionen beim PBS-Abbau oder bilden sie ein gemeinsames Heterodimer?

2.4.1 Charakterisierung von rekombinanten NblA1 und NblA2

Um zunächst die Struktur und den Oligomerisierungszustand von NblA1 und NblA2 untersuchen zu können, wurden beide Proteine rekombinant in *E. coli* exprimiert. Als Expressions- und Reinigungssystem wurde dafür, schon im Vorfeld dieser Arbeit, das pET System mit dem Expressionsvektor pET11a gewählt, der es ermöglicht Proteine ohne Affinitäts-*Tag* zu reinigen. Die Reinigung beider Proteine erfolgte nach der heterologen Expression in *E. coli* mittels Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Größenausschlusschromatografie. Jedoch konnte trotz Variation der Expressionsbedingungen nur NblA2 in ausreichender Menge aus dem löslichen Extrakt gereinigt werden, während NblA1 im unlöslichen Teil des Zellextraktes verblieb. Aufgrund des positiven Effekts von GST auf Löslichkeit und Stabilität von Proteinen [197, 198], wurde NblA1 deshalb mit C-terminalem GST-*Tag* exprimiert. Die Reinigung erfolgte durch Glutathion-Agarose mit anschließender Abspaltung des Affinitäts-*Tags* an der spezifischen PreScission®-Protease-Erkennungssequenz zwischen Protein und *Tag*, wodurch am NblA1 kein potentiell störender *Tag* verblieb.

2.4.1.1 Sekundärstruktur und Oligomerisierungszustand von NblA1 und NblA2

Zunächst wurde die Sekundärstruktur der rekombinant erzeugten Proteine mittels Circular dichroismus (CD)-Spektren untersucht. CD wird bei der Wechselwirkung von polarisiertem Licht mit optisch aktiven Substanzen beobachtet. Er beschreibt die unterschiedliche Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht. Die resultierende elliptische Polarisation des Lichtes, die Elliptizität (Θ), ist das Maß der Absorptionsdifferenz. Bei Peptiden und Proteinen wird der CD im fernen UV-Teil des Spektrums (190-240 nm) durch asymmetrische Elemente im Bereich des Peptidrückgrates hervorgerufen. Die Peptidbindung stellt zusammen mit dem benachbarten C $_{\alpha}$ -Atom einen optisch aktiven Chromophor dar. Das Zusammenwirken aller Peptidchromophore, das entscheidend von der Konformation des Peptidrückgrates bestimmt wird, führt zu einem spezifischen, von der Sekundärstruktur der Peptide/Proteine abhängigen Verlauf des CD-Spektrums, sodass α -Helices und β -Faltblattstrukturen im CD-Spektrum sichtbar sind.

Zur Analyse der Sekundärstruktur wurden die gereinigten Proteine mittels Fern-CD-Spektroskopie untersucht. Als Kontrolle diente NblA₇₁₂₀, dessen Kristallstruktur 2006 durch unsere Arbeitsgruppe aufgeklärt werden konnte [192] .

Abbildung 2.4 A zeigt die erhaltenen CD-Spektren der drei untersuchten Proteine im fernen UV. Alle Spektren wiesen einen Verlauf mit zwei Minima der molaren Elliptizität zwischen 208-210 nm und ca. 222 nm und einem einzigen Maximum zwischen 191-193 nm auf. Dies stellt den charakteristischen Verlauf der molaren Elliptizität für α -helikale Strukturen dar und weist auf einen hohen Anteil dieser hin, eine nähere Aussage über weitere Strukturelemente in der Sekundärstruktur kann anhand des Spektrums jedoch nicht getroffen werden.

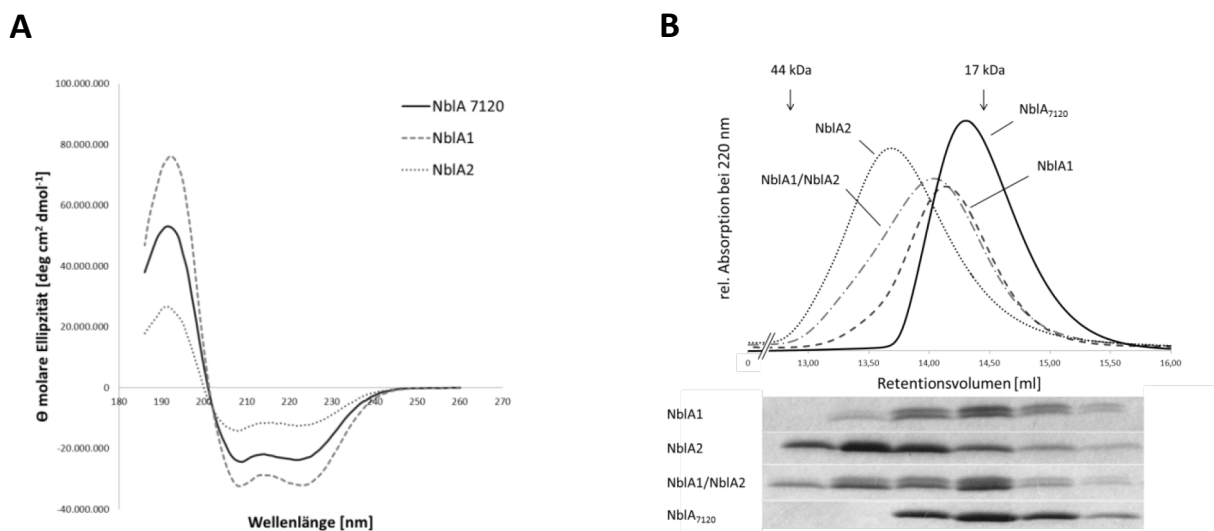
Um die Sekundärstruktur von NblA1 und NblA2 näher auszuwerten, wurde das Programm DichroWeb verwendet (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>). DichroWeb ist ein webbasierter Server, der es erlaubt CD-Daten mithilfe von verschiedenen Softwarepaketen zu analysieren [199, 200, 201] . Die Auswertung der CD-Spektren erfolgte mit den algorithmischen Programmen CDSSTR, SELCON und CONTIN. Für die Sekundärstrukturanalyse wurden die Datensätze 3, 4, 6, 7 und SP175 der Datenbanken von Referenzproteinen mit bekannter Kristallstruktur und der dazugehörigen CD-Spektren verwendet, die die Auswertung im Wellenlängenbereich zwischen 185 bis 240 nm ermöglichten. Als Qualitätsmerkmal der Auswertung diente der aus jedem Datensatz abgeleitete NRMSD-Wert (*normalized root mean square deviation* – normierte Standardabweichung). Anhand dieses Wertes wurden errechnete Ergebnisse, die nicht im Rahmen der vertretbaren Standardabweichung waren, aussortiert. Für die Algorithmus-Programme CDSSTR oder CONTIN wurden nur Ergebnisse mit einem NRMSD-Wert kleiner 0,1 verwendet, wohingegen bei SELCON-Berechnungen die NRMSD-Wert 0,258 nicht überschreiten durften. Zusätzlich musste die graphische Anpassung (*fit*) des errechneten Spektrums mit dem experimentell ermittelten Spektrum die kleinstmögliche Differenz aufweisen. Die anhand der Datensätze durch die drei Algorithmen errechneten Daten der Sekundärstrukturelemente von NblA₇₁₂₀, NblA1 und NblA2 wurden gemittelt, zusammengefasst und sind in Abbildung 2.4 C in Prozent angegeben, zusätzlich wurde die Aminosäurezahl der berechneten Sekundärstrukturen ermittelt und in der Tabelle 2.4 C dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen für NblA1 mit 89,7 Prozent einen hohen Anteil an α -helikalen Strukturelementen, wohingegen NblA2 mit 43,2 Prozent einen weitaus geringeren Anteil an α -Helices aufweist. Vergleicht man dies mit dem schon kristallisierten NblA₇₁₂₀ wird deutlich, dass NblA1 einen deutlich höheren und NblA2 einen deutlich niedrigeren Anteil an α -helikalen Strukturelementen besitzt. Die überwiegend α -helikale Struktur von NblA1 macht es wahrscheinlich, dass es die von allen kristallisierten NblA-Proteinen gezeigte Struktur aus zwei antiparallel angeordneten α -Helices teilt. NblA2 besitzt mit 43,2 Prozent ebenfalls große α -helikale Bereiche, die auf eine ähnliche Sekundärstruktur hindeuten könnten. Jedoch finden sich im Gegensatz zu NblA₇₁₂₀

und NblA1 über 10 % an β -Faltblattstrukturen und große ungeordneten Bereiche im Protein, die auch eine andere Form von NblA2 nicht ausschließen.

Die Ergebnisse zeigen, dass NblA1 wahrscheinlich die von allen kristallisierten NblA-Proteinen gezeigte Struktur aus zwei antiparallel angeordneten α -Helices teilt, wohingegen die Struktur von NblA2 von dieser abweichen könnte. Da die Funktionalität von NblA1 und NblA2 *in vitro* noch nicht gezeigt wurde, kann man eine nicht korrekte Faltung nach der heterologen Expression in *E. coli* nicht ausschließen. Auch könnte eine korrekte Faltung nur bei der Ausbildung eines Heterodimers aus NblA1 und NblA2 möglich sein.

Um Aufschluss über die Frage: „Bilden NblA1 und NblA2 zwei Homodimere oder ein Heterodimer?“ zu erhalten wurde der native Oligomerisierungszustand der rekombinanten Proteine mithilfe einer Größenausschlusschromatografie untersucht. Dafür wurden in einem ersten Lauf NblA1, NblA2 und NblA₇₁₂₀ an einer SuperdexTM 75 10/300GL-Säule chromatographiert, wobei NblA₇₁₂₀ als Kontrolle diente. Die Größe der eluierten Oligomere wurde anhand von Markerproteinen bestimmt und die, während des Säulenlaufes in 0,5 ml Fraktionen gesammelten, Eluate durch eine DOC/TCA-Fällung konzentriert und mittels SDS-PAGE analysiert.



C

	α -Helix		β -Faltblatt		β -Turn		ungeordnet	
	AS	%	AS	%	AS	%	AS	%
NblA ₇₁₂₀	45	69,3	1,5	2,3	6	9,1	13	19,7
NblA ₇₁₂₀ (Kristallstruktur)	44	68						
NblA1	55,6	89,7	1	1,5	2,2	3,5	3	4,9
NblA2	26	43,2	7	11,7	10	17	17	28

Abbildung 2.4: Biologisch aktive Struktur von NblA1 und NblA2 **A:** NblA₇₁₂₀, NblA1 und NblA2 im CD-Spektrum. Aufgenommen in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,5 bei 20 °C mit einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml in einem Jasco-715 Spektropolarimeter (Jasco Instruments). Die Spektren wiesen ein Minimum der molaren Elliptizität bei 209 nm (NblA₇₁₂₀) oder 210 nm (NblA1 und NblA2) sowie bei 222 nm (NblA₇₁₂₀), oder 221 nm (NblA1 und NblA2) auf. Das einzige Maximum der molaren Elliptizität war bei 191 nm (NblA₇₁₂₀, NblA1) und 192 nm (NblA2) zu erkennen. **B:** Untersuchung des Oligomerisierungszustands der NblA-Proteine NblA1, NblA2 und NblA₇₁₂₀ mittels Größenausschlusschromatographie.

100 µg NblA1, NblA2, NblA1/NblA2 und NblA₇₁₂₀ wurden in Tris-Puffer A an einer SuperdexTM 75 10/300GL-Säule chromatographiert. Die Elution der Proteine wurde durch Absorption bei 220 nm verfolgt. Die Größe der eluierten Proteinkomplexe wurde durch die Größen von Standardproteinen, die unter den gleichen Versuchsbedingungen aufgetrennt wurden, ermittelt. Das Elutionsvolumen der Proteine lag bei 13,68 ml (errechnetes Molekulargewicht 26,92 kDa) für NblA2, 14,03 ml (errechnetes Molekulargewicht 21,62 kDa) für NblA1/NblA2, 14,15 ml (errechnetes Molekulargewicht 20 kDa) für NblA1, und 14,3 ml (errechnetes Molekulargewicht 18,19 kDa) für NblA₇₁₂₀. Die Eluate der Säulenläufe wurden durch eine DOC/TCA-Fällung konzentriert, mittels SDS-PAGE analysiert und die aufgetrennten Proteine durch Coomassie angefärbt. C: Anhand der CD-Spektren errechnete Sekundärstrukturelemente der NblA-Proteine NblA1, NblA2 und NblA₇₁₂₀. Die Aminosäurezahl für die berechneten Sekundärstrukturen wurde aus den ermittelten Prozentangaben, bezogen auf die Gesamtproteinlänge (NblA₇₁₂₀ besteht aus 65AS, NblA1 aus 62 AS und NblA2 aus 60 AS), ermittelt.

Die erhaltenen Chromatogramme (Abbildung 2.4 B) zeigten jeweils einen Proteinpeak bei einem spezifischen Elutionsvolumen, anhand dessen unter zur Hilfenahme der Retentionsvolumina der Standardproteine die Masse der Proteine bestimmt werden konnte. So eluierte NblA2 mit einer errechneten Masse von 26,92 kDa als erstes von der Säule, gefolgt von NblA1 mit einem errechneten Molekulargewicht von 20 kDa und NblA₇₁₂₀ mit einem errechneten Molekulargewicht von 18,9 kDa. Alle drei Proteine lagen somit nicht als Monomer, sondern in einem höheren Oligomerisierungszustand vor. Mit 18,19 kDa eluierte NblA₇₁₂₀ dabei rein rechnerisch als Dimer/Trimer-Komplex von der Säule, was auch vorrangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe entspricht, obwohl die biologisch aktive Form das Dimer ist [192]. Auch NblA1 scheint mit 20 kDa als Dimer/Trimer-Komplex vorzuliegen, wohingegen NblA2 mit 26,92 kDa eher als Trimer/Tetramer-Komplex von der Säule zu eluieren scheint.

Die Größenausschlusschromatographie zeigt somit, dass NblA1 und NblA2 in der Lage sind homooligomere Komplexe auszubilden, die rein rechnerisch dem Oligomerisierungszustand eines Trimers oder Tetramers entsprechen. Genauere Bestimmungen des Oligomerisierungszustandes sind mit dieser Methode jedoch nicht möglich.

Um festzustellen, ob NblA1 und NblA2 miteinander interagieren, wurden in einem weiteren Versuch NblA1 und NblA2 1:1 gemischt und gemeinsam chromatographiert. Wie in Abbildung 2.4 B zu erkennen eluierte das Gemisch aus NblA1 und NblA2 bei einem Retentionsvolumen, welches zwischen dem von NblA2 und NblA1 liegt und einer errechneten Masse von 21,62 kDa entspricht. Somit eluierte NblA2 in dem Proteingemisch später und NblA1 früher als in den einzelnen Säulenläufen. Auffällig ist zusätzlich, dass im Polyacrylamidgel der fraktionierten Proteine eine frühere Elution des NblA1-Proteins beobachtet werden konnte, eine spätere Elution von NblA2 jedoch nicht deutlich zu erkennen war. Aufgrund dieses Ergebnisses ist ein Gemisch aus homooligomeren und heterooligomeren Komplexen denkbar.

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass NblA1 und NblA2 oligomere Strukturen ausbilden, wobei aber das Vorliegen eines Homo- oder Heterooligomers nicht feststellbar ist. Die Ergebnisse der CD-Spektroskopie und die schon aufgeklärte Struktur anderer NblA-Proteine [192, 193] sprechen für die Bildung eines Dimers, auch wenn die NblA-Proteine scheinbar in größeren oligomeren Strukturen von der Säule eluieren. Die vordergründige Frage, ob das Heterodimer oder Homodimer die biologisch

aktive Form darstellt, bleibt jedoch bestehen und kann nicht mithilfe der Größenausschlusschromatografie beantwortet werden.

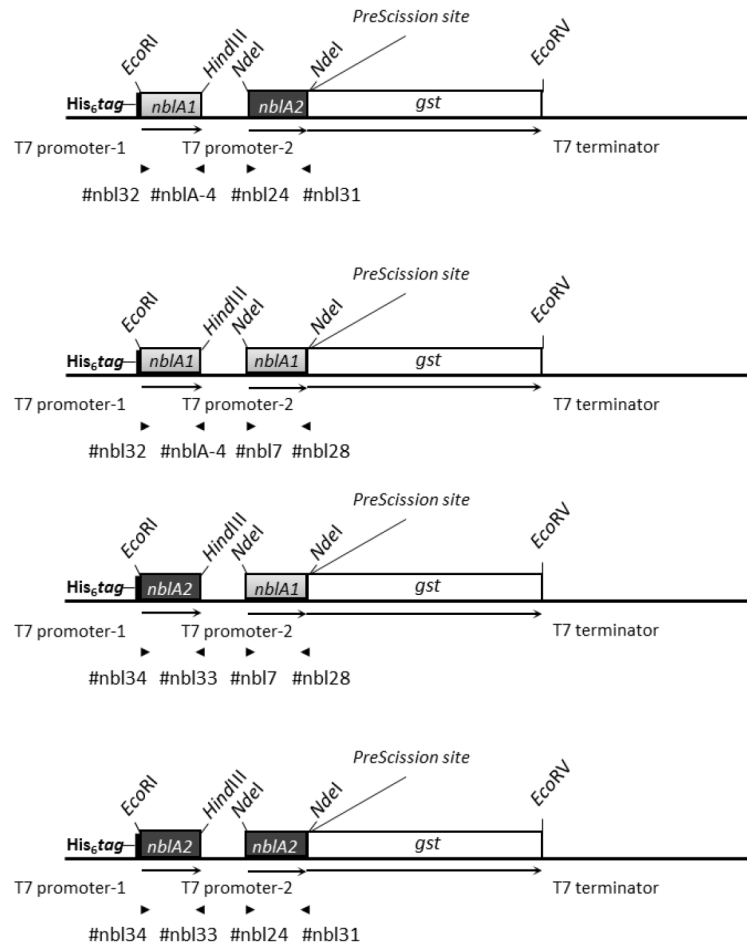
2.4.2 *In vitro*-Untersuchungen zur Interaktion von NblA1 und NblA2

Um weiter zu untersuchen ob NblA1 und NblA2 zwei Homo- oder ein Heterodimer bilden, wurden *in vitro-pulldown*-Versuche mit NblA1 und NblA2 durchgeführt. Da in *Synechocystis* 6803 *nblA1* und *nblA2* dicistronisch exprimiert werden [189], wurde dies für die rekombinanten NblA-Proteine durch Koexpression auf einem Plasmid nachgebildet. Dafür wurden beide *nblA*-Gene von einem Duet-Expressionsvektor (Invitrogen) mit zwei T7-Promotor- und Terminatorregionen exprimiert. Zwar wurden die Proteine dabei nicht von der gleichen mRNA translatiert, wie es in *Synechocystis* 6803 vermutlich der Fall ist, jedoch konnte durch die räumliche Nähe bei der Koexpression eine Heterodimerisierung direkt nach der Translation und Faltung der Proteine erfolgen. Auch wurde durch die gleichmäßige Expression von NblA1 und NblA2 eine eventuell nicht dem biologisch aktiven Zustand entsprechende Homodimerisierung, aufgrund der Abwesenheit des Interaktionspartners vermieden.

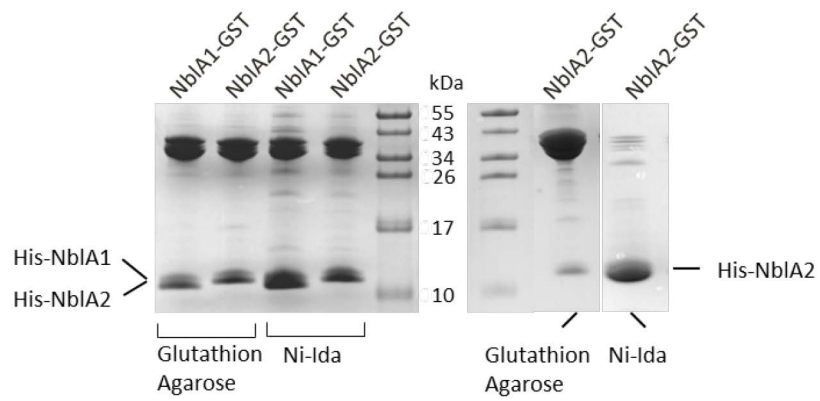
Für die Untersuchung der Interaktion zwischen den NblA-Proteinen wurden beide *nblA*-Gene mit einem Affinitäts-*Tag* kloniert. Dabei erhielten NblA1 und NblA2 entweder einen N-terminalen His-*Tag* oder einen C-terminalen GST-*Tag* (Abbildung 2.5 A), sodass die Reinigung über zwei verschiedene Affinitätsmatrizen erfolgen konnte. Um auch eine mögliche Homodimerbildung zu untersuchen, wurden zusätzlich je zwei *nblA1*- bzw. *nblA2*-Gene vom pACYC-Duet-Vektor exprimiert, wobei eines N-terminal mit *his* und das andere C-terminal mit *gst* fusioniert war (Abbildung 2.5 A). Das Einfügen einer Proteaseschnittstelle zwischen NblA und GST-*Tag* erlaubte es zusätzlich bei Bedarf das NblA-Protein von seinem *Tag* zu lösen, sodass kein potentiell störender *Tag* am C-Terminus verblieb.

Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte aus löslichem *E. coli*-Zellextrakt über eine Glutathion- oder Ni-Ida-Matrix. Nicht an die Matrix gebundene Proteine wurden durch waschen entfernt und mit dem immobilisierten Protein interagierende Proteine konnten gemeinsam mit diesem eluiert werden. Die Reinigung von His-NblA1/NblA1-GST war jedoch nicht möglich, da bei der Koexpression der Hauptteil der NblA1-Proteine in der unlöslichen Fraktion verblieb.

A



B



C

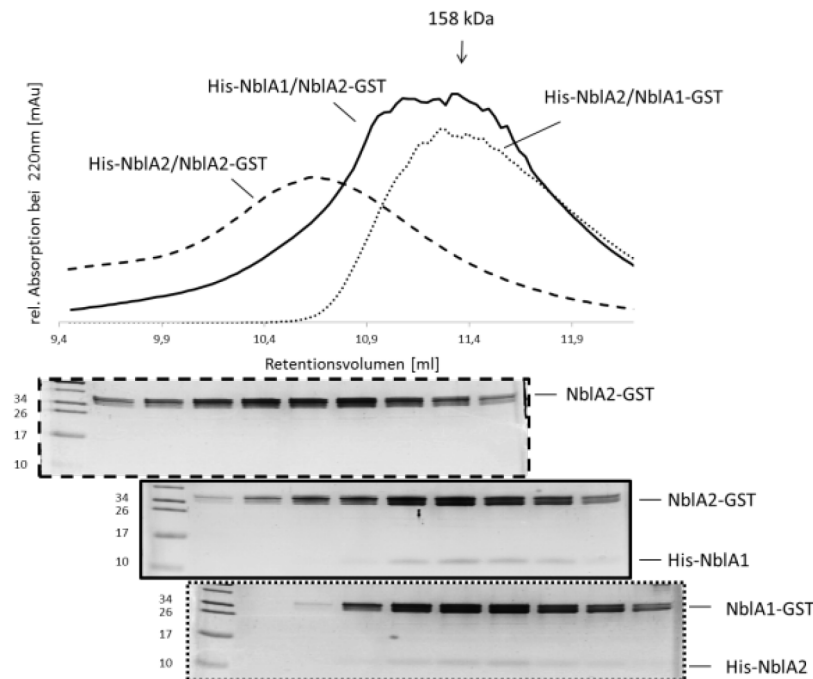


Abbildung 2.5: Interaktion von NblA1 und NblA2. **A:** Schematische Darstellung der konstruierten Expressionsplasmide. Die Lage der für die Konstruktion eingesetzten Primer ist mit Pfeilen markiert. Die in den Klonierungen verwendeten Restriktionsorte im Gen sind gekennzeichnet. **B:** Koreinigung der NblA-Fusionsproteine. Nach der heterologen Koexpression und Sedimentation der Zellen, wurden die Zellpellets in Tris-Puffer A aufgenommen. Nach der Herstellung der löslichen Zellextrakte wurden diese in jeweils zwei gleich große Aliquots geteilt. Eine Hälfte der löslichen Zellextrakte wurde mit Glutathion-Agarose und die andere mit Ni-IDA-Resins versetzt. Nicht an die Matrizen gebundene Proteine wurden durch mehrere Waschschrte entfernt und gebundenen Proteine mit glutathion- bzw. imidazolhaltigem Elutionspuffer eluiert. Die Proteine wurden durch eine DOC/TCA-Fällung konzentriert und mittels SDS-PAGE analysiert. **C:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatografie der kogereinigten Fusionsproteine. Die Elution der Proteine wurde durch Absorptionsmessung bei 220 nm detektiert. Die Größe der eluierten Proteinkomplexe wurde durch die Größen von Standardproteinen, die unter den gleichen Versuchsbedingungen aufgetrennt wurden, ermittelt. Die Proteine im in 250 µl Fraktionen gesammelten Eluat wurden durch DOC-TCA-Fällung konzentriert und mithilfe einer SDS-PAGE analysiert. Nach der Größenausschlusschromatografie der kogereinigten Fusionsproteine His-NblA1/NblA2-GST wurden die Fraktionen, die bei einem Retentionsvolumen zwischen 9,95 ml und 11,95 ml gesammelt wurden, aufgetragen. Nach Separation von His-NblA2/NblA1-GST wurden die Elutionsfraktionen von 10,2 ml bis 12,2 ml aufgetragen, während für den Homooligomer-Ansatz (HisNblA2/NblA2-GST) die Fraktionen zwischen 9,45 ml und 11,45 ml Retentionsvolumen verwendet wurden.

Die Ergebnisse der durchgeführten Koreinigungen mit Glutathion-Agarose und Ni-Ida-Resins sind in Abbildung 2.5 B dargestellt. Die Auswertung der SDS-PAGE zeigt deutlich, dass NblA1 und NblA2 zusammen aus dem Zellextrakt gereinigt werden konnten, wobei der verwendete Affinitäts-Tag und die verwendete Affinitätsmatrix-Matrix keine Rolle spielten. Bei His-NblA2/NblA2-GST erfolgte ebenfalls eine Koreinigung der Proteine, jedoch konnte hier nur weitaus geringere Proteinkonzentration des Interaktionspartners mit gereinigt werden, was auf eine schwächere Bindung zwischen den NblA2-Proteinen oder weniger gebildete Homooligomere hindeutet.

Auch durch Größenausschlusschromatografie konnte eine Interaktion zwischen NblA1 und NblA2 gezeigt werden. Hier wurden die gereinigten rekombinanten Proteine NblA1-GST/His-NblA2, NblA2-GST/His-NblA1 und NblA2-GST/His-NblA2 je in einem Lauf an der Superdex™75 10/300GL-Säule chromatographiert. Zwar zeigten die erhaltenen Elutionsprofile einen breiten Elutionspeak, mit großen, oligomeren Proteinkomplexen um die 160-280 kDa und damit keine Dimerisierung. Doch konnte eine Interaktion anhand der gesammelten und mittels SDS-PAGE ausgewerteten

Elutionsfraktionen gezeigt werden. Diese wiesen in den Fraktionen der Proteinkomplexe NblA1-GST/His-NblA2 und NblA2-GST/His-NblA1 zwei distinkte Proteinbanden, eine bei 33 kDa (GST-Fusionsprotein) und eine bei 10 kDa (His-Fusionsprotein), auf. Das Vorhandensein beider Fusionsproteine in den Eluatfraktionen impliziert somit eine Interaktion zwischen NblA1 und NblA2. Betrachtet man dagegen den Säulenlauf von GST-NblA2 und His-NblA2, ist nur eine Proteinbande bei 33 kDa zu erkennen und somit keine Interaktion zwischen den NblA2-Proteinen nachweisbar.

Die Ergebnisse beider Versuche mit rekombinanten NblA-Proteinen zeigen eine Interaktion zwischen NblA1 und NblA2. Des Weiteren ist auch eine Interaktion zwischen zwei NblA2-Proteinen nachweisbar, diese Homodimerisierung ist aber bei weitem nicht so stabil, wie die Bildung des Heterodimers. Die biologisch aktive Form ist demnach wahrscheinlich das Heterodimer aus NblA1 und NblA2.

2.4.3 *In vivo*-Untersuchungen zur Interaktion von NblA1 und NblA2

Um den Nachweis einer Interaktion zwischen NblA1 und NblA2 *in vivo* zu erbringen, wurde das Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ausgenutzt. FRET ist der physiologische Prozess bei dem Energie von einem angeregten Donormolekül strahlungslos auf ein Akzeptormolekül übertragen wird. Die Effizienz dieser Energieübertragung hängt von dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor ab, der zwischen 1-10 nm liegen muss, die FRET-Effizienz nimmt dabei mit steigendem Abstand der Fluoreszenzmoleküle zueinander in der sechsten Potenz ab. FRET tritt also nur auf, wenn der FRET-Donor und der FRET-Akzeptor in räumliche Nähe gebracht werden. Neben dem Abstand sind die spektralen Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe von entscheidender Bedeutung für das FRET-Signal. Für die am häufigsten eingesetzten Fluoreszenzproteine CFP (*cyan fluorescent protein*) als Donor und YFP (*yellow fluorescent protein*) als Akzeptor sind diese in Abbildung 2.6 dargestellt. Die Fluoreszenzemission des Donors muss mit der Anregung des Akzeptors überlappen, wodurch der Donor durch seine Emission direkt den Akzeptor zur Fluoreszenz anregen kann. Das bedeutet, dass im Falle von FRET YFP-Fluoreszenz emittiert, obwohl CFP angeregt wurde. Dieses Verfahren ermöglicht somit die Interaktionsanalyse von nativen Proteinen in lebenden Zellen. Das FRET-Signal kann dabei auf unterschiedliche Weisen gemessen werden. Etablierte Methoden sind die Fluoreszenz-Mikroskopie und die Fluoreszenzspektroskopie. Grundsätzlich muss dabei aber zwischen zwei Messmethoden unterschieden werden: den *steady state*-Messungen, bei denen man nach Anregung bei einer bestimmten Wellenlänge die Intensität der Emission von Donor und Akzeptor bestimmt und den zeitaufgelösten (*time resolved*)-Messungen, bei denen die Reduktion der Lebenszeit des Donors in Anwesenheit des Akzeptors bestimmt wird. *Steady state*-Messungen sind häufig weniger zeitaufwändig, besitzen im Vergleich zu zeitaufgelösten Messungen jedoch ein höheres Fehlerpotential. Hier kann z. B. die direkte Anregung des FRET-Akzeptors durch die

Anregungswellenlänge des Donors zu einer Signalkontamination führen. Auch die Möglichkeit des „spektralen Durchblutens“ (*bleed-through*), bei dem das Donor-Emissionsspektrum das FRET-Signal kontaminiert, ist zu beachten. Um die genannten Fehlerquellen auszuschließen, sind deshalb geeigneten Negativkontrollen von entscheidender Bedeutung.

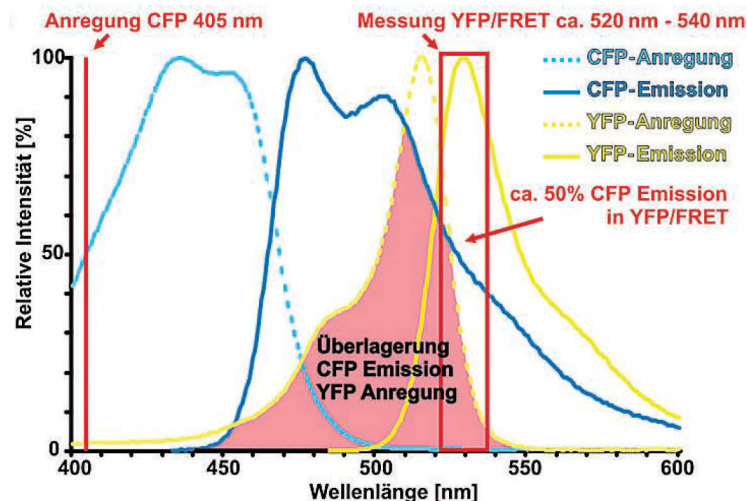


Abbildung 2.6: Exzitations-(gestrichelt) und Emissions-Spektrum (durchgehend) von CFP (blau) und YFP (gelb) [202] .

Ein generelles Problem beider Methoden kann die Verwendung von Fluorophoren für Interaktionsstudien in Organismen mit fluoreszierenden Metaboliten, wie z. B. in photoaktiven Organismen wie Cyanobakterien, darstellen. Die photoaktiven Moleküle weisen zum Teil eine spektrale Ähnlichkeit zum Emissionsspektrum des FRET-Akzeptors auf oder die Emissionsspektren überlappen sogar. In diesen Fällen strahlen die natürlich in den Organismen vorkommenden, fluoreszierenden Bestandteile in den zu detektierenden Wellenlängenbereich ein und erzeugen ein deutliches Hintergrundsignal (Rauschen). Mithilfe spezieller optischer Filtersets (Bandpass-Filter) können Hintergrundsignale stark vermindert werden, wobei jedoch die Sensitivität des Systems sinkt.

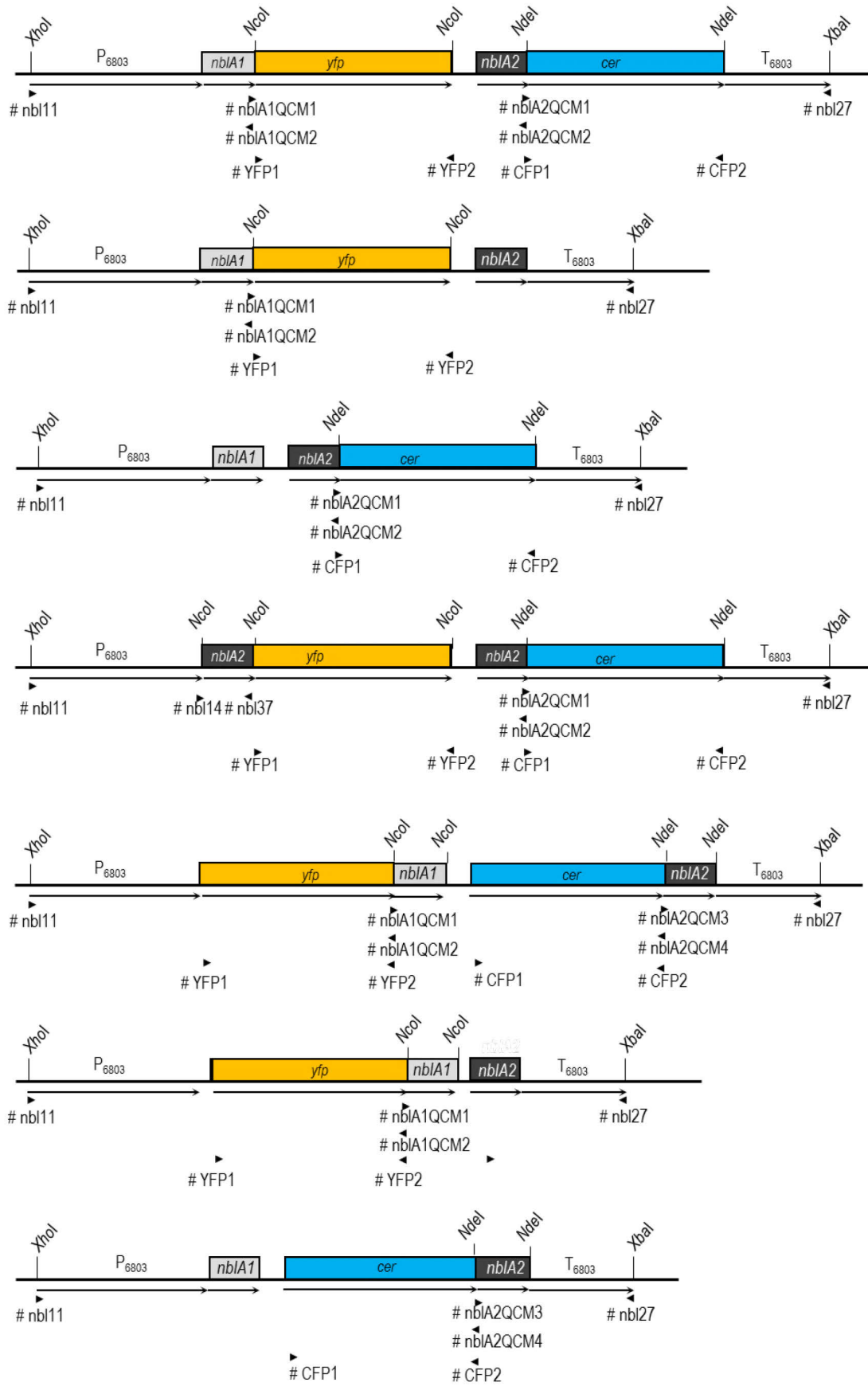
2.4.3.1 Konstruktion und Untersuchung der Mutanten

Für die Interaktionsanalyse von NbIA1 und NbIA2 wurden als FRET-Paar Cerulean [203] als FRET-Donor und YFP als FRET-Akzeptor gewählt. Cerulean ist eine verbesserte Variante des CFP, das dank eines Aminosäureaustausches 2,5-mal heller fluoresziert. Mit dieser heller fluoreszierenden Variante sollte verhindert werden, dass die Eigenfluoreszenz der photoaktiven Cyanobakterien das FRET-Signal überstrahlt. Bei dem FRET-Paar Cerulean - YFP macht die spektrale Überlappung der Donoremission (Exzitations-/Emissions-Maxima 433/475 nm) von Cerulean mit der Akzeptoranregung (Exzitations-/Emissions-Maxima 514/527 nm) von YFP die Energieübertragung vom Donor auf den Akzeptor möglich, wenn beide Fluorophore sich in räumlicher Nähe zueinander befinden. Um falsch positive FRET-Signale durch Dimerbildung von Cerulean oder YFP zu verhindern, wurde in den Genen durch gezielte Mutagenese das Basentriplet, das für die Aminosäure Alanin 206

codiert, gegen das Basentriplet für die Aminosäure Lysine ausgetauscht (A206K) [204]. Die Konstrukte für die monomeren Formen mCerulean und mYFP werden im Folgenden als Cer und YFP bezeichnet. Die verwendeten Konstrukte wurden freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe „Molekulare Biophysik“ von Herrn Prof. Dr. Hermann (HU Berlin) zur Verfügung gestellt.

Um die Interaktion von NblA1 und NblA2 während des PBS-Abbaus durch FRET untersuchen zu können, wurden die N- oder C-terminal mit den Fluorophoren fusionierten NblA-Proteine *in trans* in der $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante von *Synechocystis* 6803 exprimiert. Die Überprüfung der Funktionalität der verschiedenen Fusionsproteine erfolgte im Anschluss durch Expression der Proteine und Überprüfung der Komplementation des nicht bleichenden Phänotyps der $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante.

Für die Expression der Proteine wurde der mobilisierbare, sich autonom replizierende Shuttle-Vektor pVZ321 [196] verwendet. In diesen wurde die kodierende DNA-Sequenz der dicistronisch abgelesenen *nblA*-Gene inklusive eigener Promotor- und Terminatorsequenz kloniert. Nach einer gerichteten Mutagenese, durch die Schnittstellen in die *nblA*-Gene eingefügt wurden, wurden in diese die Gene *yfp* und *cer* am 5'- oder 3'-Ende von *nblA* inseriert (siehe auch Abbildung 2.7). Dabei wurde YFP N- oder C-terminal mit NblA1 fusioniert und Cer N- oder C-terminal mit NblA2. Um falsch positive FRET-Signale durch „spektrales Durchbluten“ oder Anregung von YFP durch die Anregungswellenlänge von Cer zu erkennen, wurden Konstrukte mit nur einem Fusionsprotein konstruiert (YFP_NblA1 oder NblA1_YFP, NblA2 bzw. NblA1, Cer_NblA2 oder NblA2_Cer). Mit einer weiteren Kontrolle sollte das Rauschen durch zufällige Energieübertragung von Cer auf YFP untersucht werden. Um bei dieser Kontrolle möglichst ähnliche Bedingungen zur Expression von NblA1_YFP, NblA2_Cer sicherzustellen, wurde NblA1 lediglich durch NblA2 ausgetauscht. In der Mutante wurde demnach das *nblA2*-Gen doppelt, C-terminal mit *yfp* oder *cer* fusioniert, exprimiert. Alle fertiggestellten pVZ-Konstrukte wurden über konjugativen Transfer in die *Synechocystis* 6803 $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante eingebracht und die erhaltenen Exkonjuganten durch Komplementationsversuche analysiert. Um die Funktionalität von NblA2_YFP, NblA2_Cer zu überprüfen wurde außerdem die $\Delta nblA2$ -Mutante von *Synechocystis* 6803, die das *nblA1*-Gen noch auf dem Chromosom trägt [189], mit dem Plasmid pVZ#NblA2_YFP, NblA2_Cer konjugiert.



200 bp

Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Konstrukte zur Expression der NblA-Fluorophor-Fusionsproteine in *Synechocystis* 6803. Die Lage der für die Konstruktion eingesetzten Primer ist mit Pfeilen markiert und die im Rahmen der Klonierung verwendeten Restriktionsorte sind gekennzeichnet.

Ob die NblA-Fluorophor-Fusionsproteine den nicht bleichenden Phänotyp der Mutante komplementieren können wurde durch den Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium überprüft und durch Absorptionsspektren dokumentiert. Dafür wurden Spektren ganzer Zellen unter Standardkulturbedingungen sowie 48 Stunden nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium aufgenommen. In Abbildung 2.8 A, B und C sind die Ergebnisse der Komplementationsversuche dargestellt. Gezeigt sind die Absorptionsspektren ganzer Zellen der einzelnen Exkonjuganten in stickstoffhaltigem Medium und 48 Stunden nach dessen Entzug. In den Absorptionsspektren ist erkennbar, dass die Exkonjuganten in stickstoffhaltigem Medium hinsichtlich ihres Chl- und PBS-Gehalts nur geringe Unterschiede aufwiesen. Entzog man ihnen jedoch den Stickstoff, waren Unterschiede im PBS-Abbau zu beobachten. So zeigte von den NblA1/NblA2-Proteinen, die mit YFP und Cer fusioniert waren, die Variante mit C-terminalen Fluorophoren (NblA1_YFP, NblA2_Cer) eine Komplementation des Wildtyp-Phänotyps, ersichtlich durch die Abnahme der PC-Absorption im Bereich von 620-630 nm (Abbildung 2.8 A). Die Mutante YFP_NblA1, Cer_NblA2 konnte hingegen den nicht bleichenden Phänotyp der $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante nicht komplementieren, erkennbar an der gleichbleibenden Amplitude des PC-Peaks bei ~623 nm (Abbildung 2.8 B). Demnach führte das „verdecken“ beider N-Termini zu einem Funktionsverlust der NblA-Proteine, wohingegen die Fusion der C-Termini mit einem Fluorophor keine Auswirkungen auf die Funktionalität hatte. Bei den Kontrollmutanten, die nur ein NblA-Fluorophor-Fusionsprotein exprimierten (z. B. die NblA1_YFP, NblA2-Mutante), war ein Abbau der PBS nach dem Entzug von Stickstoff und somit die Komplementation des Phänotyps zu beobachten. Dabei war auffällig, dass hierbei die Lokalisation des Fluorophors (ob C- oder N-terminal) und das NblA-Protein nicht entscheidend waren, solange nur eines der beiden Proteine mit einem Fluorophor fusioniert war. Die Expression der NblA2-Fluorophor-Fusionsproteine NblA2_YFP und NblA2_Cer in der $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante führte hingegen nicht zu einer Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps, erkennbar an der nahezu unveränderten PC-Absorption im Bereich von 620-630 nm. Wurden die NblA2-Fluorophorproteine allerdings in der $\Delta nblA2$ -Mutante, mit chromosomalem *nblA1*-Gen, exprimiert, kam es zum Abbau der PBS, erkennbar an der Abnahme der Absorption bei ~623 nm (Abbildung 2.8 C).

Die Untersuchung der Funktion von NblA1 und NblA2 mit N- und C-terminal fusioniertem Cer bzw. YFP zeigten, dass die Funktion von NblA1- bzw. NblA2 durch die C-terminale Fusion mit Cer oder YFP nicht beeinträchtigt war. Wohingegen eine N-terminale Fusion beider NblA-Proteine mit einem Fluorophor zu einem Funktionsverlust führte. Für die Untersuchung der Interaktion von NblA1 und

NbIA2 wurden deshalb nur NbIA1- und NbIA2-Proteine verwendet, die C-terminal mit Cer oder YFP fusioniert waren.

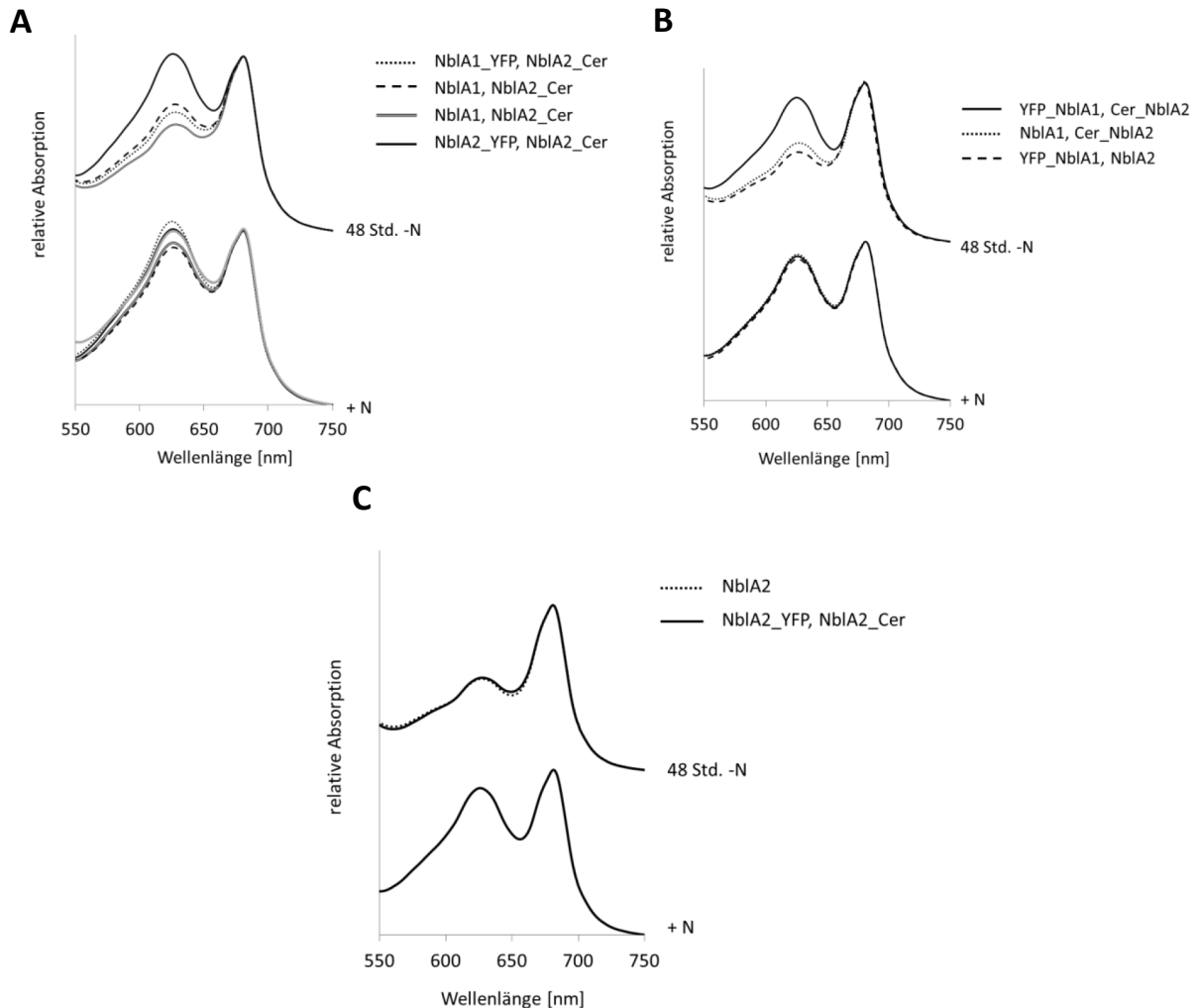


Abbildung 2.8: Komplementationsanalysen durch Expression von NbIA-Fluorophor-Fusionsproteinen in der $\Delta nbIA1/nbIA2$ *Synechocystis* 6803-Mutante bzw. der $\Delta nbIA2$ *Synechocystis* 6803-Mutante. Dargestellt sind Absorptionsspektren ganzer Zellen beim Wachstum in Standardkulturmedium (+N) sowie 48 Stunden nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium. Die Absorptionsspektren der -N-Kulturen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit entlang der Ordinate verschoben. Die Spektren wurden auf die optische Dichte bei 750 nm und auf das Absorptionsmaximum des Chl *a* bei 680 nm normiert. **A:** Die Expression von NbIA1_YFP NbIA2_Cer *in trans* komplementiert den nicht bleichenden Phänotyp der $\Delta nbIA1/nbIA2$ -Mutante von *Synechocystis* 6803. **B:** Die Expression von YFP_NbIA1 Cer_NbIA2 *in trans* kann den nicht bleichenden Phänotyp der $\Delta nbIA1/nbIA2$ -Mutante von *Synechocystis* 6803 nicht komplementieren. **C:** Die Expression von NbIA2_YFP NbIA2_Cer *in trans* komplementiert den nicht bleichenden Phänotyp der $\Delta nbIA2$ -Mutante von *Synechocystis* 6803.

Neben der Funktionalität der Fusionsproteine wurde vor Beginn der Fluoreszenzmessungen überprüft, ob die exprimierten Proteine in vollständiger Länge vorlagen. Dies war nötig um sicherzustellen, dass kein teilweiser Abbau oder sogar eine Abspaltung des Fluorophors vorlag. Auch sollte die Expression der NbIA-Varianten unter Stickstoffmangel im zeitlichen Verlauf erfasst werden, um ein mögliches FRET-Signal mit dem Expressionsverlauf nach der Stickstoffdepletion in Korrelation setzen zu können. Dafür wurden die, den Wildtyp-Phänotyp wieder herstellende, NbIA1_YFP, NbIA2_Cer-Mutante sowie die dazugehörigen Kontrollmutanten NbIA1_YFP, NbIA2, NbIA1,

NbIA2_Cer und NbIA2_YFP, NbIA2_Cer Δ nbIA1/nbIA2 *Synechocystis* 6803 durch Fluoreszenzspektroskopie und Immunoblotanalysen untersucht.

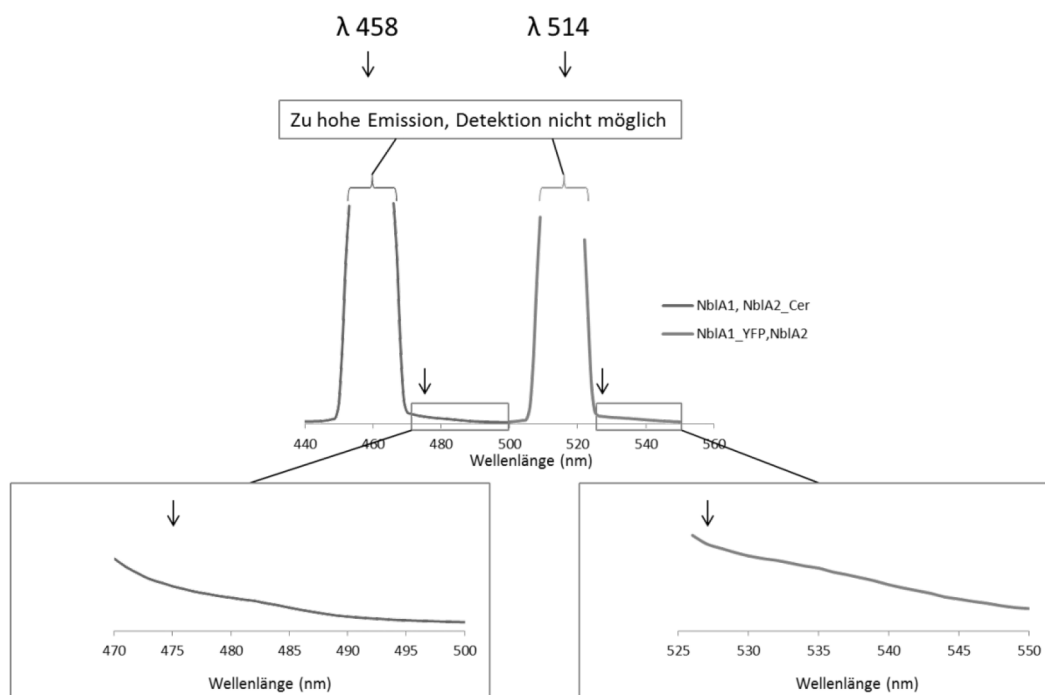
Für die Analyse der Expression der verschiedenen NbIA-Varianten wurden die jeweiligen *Synechocystis* 6803-Mutanten in stickstoffhaltigem Medium angezogenen und die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindenden Kulturen in stickstofffreies Medium überführt. Direkt nach dem Stickstoffentzug, sowie 3, 5, 8 und 24 Stunden später wurden Proben entnommen und analysiert. Für die Analyse der Expression anhand von Emissionsspektren wurden 3 ml Zellkultur mit einer OD₇₅₀ von 0,3 vermessen. Dabei wurde die jeweilige Kultur für die Expression von Cer bei einer Wellenlänge von 458 nm angeregt und die Emission in einem Bereich von 440-500 nm verfolgt. Die Expression von YFP konnte durch Anregung bei 514 nm und Detektion der Emission zwischen 500-560 nm analysiert werden. Die Immunodetektion der NbIA-Proteine erfolgte mit dem löslichen Teil des *Synechocystis* 6803-Zellextraktes von geernteten und aufgeschlossenen Zellen. Die im Anschluss mittels einer SDS-PAGE separierten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion von NbIA1 und NbIA2 erfolgte mit einem Mix aus NbIA1- und NbIA2-Antikörper, der Fluorophorteil der Proteine wurde mit einem GFP-Antikörper (nicht gezeigt) markiert.

In Abbildung 2.9 sind die Ergebnisse der zwei erläuterten Versuche dargestellt. Die Emissionsspektren in Abbildung 2.9 A zeigen die Anregung von Cer bei einer Wellenlänge von 458 nm in der NbIA1, NbIA2_Cer-Mutante (blau) und die Anregung von YFP bei einer Wellenlänge von 514 nm in der NbIA1_YFP, NbIA2-Mutante von *Synechocystis* 6803 nach 8 Stunden unter Stickstoffmangelbedingungen. Deutlich zu erkennen ist der durch die Anregung verursachte Streulichtpeak, der über das Detektionsvermögen des Fluoreszenzspektrometers hinausgeht. Die zusätzlich dargestellten Ausschnitte unter den Emissionsspektren zeigen den Emissionsbereich der angeregten Fluorophore, wobei die Maxima von Cer und YFP durch Pfeile markiert sind. Aus den dargestellten Ausschnitten der Emissionsspektren wird deutlich, dass eine Detektion des Emissionspeaks von Cer oder YFP nicht möglich war. Der Grund dafür ist die hohe, natürliche Eigenfluoreszenz der Zellen, die zu einer Streuung des eintretenden Anregungslichts führt, sodass die viel geringer ausfallende Emission der Fluorophore in der Schulter des Streulichtpeaks verborgen bleibt. Eine Untersuchung der Expression der Fluorophore durch die Anregung von Cer oder YFP war demnach nicht möglich.

Die Ergebnisse des Immunoblots sind in Abbildung 2.9 B dargestellt. Dieser zeigt die Expression der *in trans* exprimierten NbIA-Varianten nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium. Innerhalb der ersten acht Stunden nach dem Entzug von Stickstoff ist in allen Mutanten ein Anstieg der NbIA1- und NbIA2-Konzentration in Form einer sich verstärkenden Bandenintensität erkennbar, die nach 24 Stunden wieder abfällt. In den Mutanten NbIA1, NbIA2_Cer und NbIA1_YFP, NbIA2 sind dabei zwei NbIA-Proteine detektierbar, wobei die obere Bande das NbIA-Fluorophor-Fusionsprotein

mit einer Größe von ca. 34 kDa repräsentiert und die untere Bande NblA1 bzw. NblA2 mit einer Größe von ~7 kDa darstellt. In den Mutanten NblA1_YFP, NblA2_Cer und NblA2_YFP, NblA2_Cer ist dagegen nur eine Bande feststellbar. Das Signal ist dafür im Vergleich zu den anderen beiden Mutanten ca. doppelt so intensiv und zeigt die Expression beider ca. 34 kDa großer Fusionsproteine an. Neben den distinkten Banden für das NblA-Fusionsprotein und NblA1 bzw. NblA2 sind im Immunoblot keine weiteren Signale feststellbar. Dies deutet darauf hin, dass die NblA-Fusionsproteine in den Zellen nicht teilweise abgebaut vorliegen.

A



B

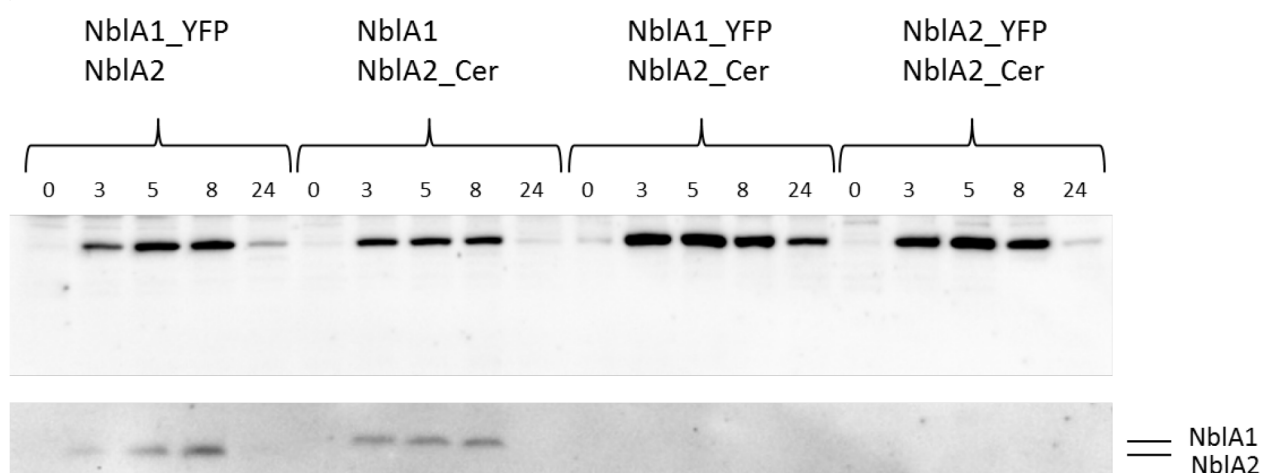


Abbildung 2.9: Analyse der Expression der NblA1/NblA2-Fluorophor-Fusionsproteine nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium. Die Induktion der Expression der NblA-Fluorophor-Fusionsproteine erfolgte durch den Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium. **A:** Emissionsspektren ganzer Zellen. 3 ml Zellkultur mit einer OD_{750} von 0,3

wurden 8 Stunden nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff vermessen. Exprimiertes Cer in der NblA1, NblA2_Cer-Mutante wurde bei einer Wellenlänge von 458 nm angeregt und die Emission in einem Bereich von 440-500 nm verfolgt. Exprimiertes YFP in der NblA1_YFP, NblA2-Mutante wurde bei einer Wellenlänge von 514 nm angeregt und die Emission zwischen 500-560 nm verfolgt. Aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz von *Synechocystis* 6803 war eine Detektion der Cer-, bzw. YFP-Fluoreszenz nicht möglich. **B.** Immunoblot der NblA-Fluorophor-Fusionsproteine. Die zu den Zeitpunkten 0, 3, 5, 8 und 24 Stunden nach dem Entzug von Stickstoff geernteten Zellen der NblA1_YFP, NblA2-Mutante, der NblA1, NblA2_Cer-Mutante; der NblA1_YFP, NblA2_Cer-Mutante und der NblA2_YFP, NblA2_Cer-Mutante wurden in Na/K-Phosphatpuffer (pH 7,6) resuspendiert, mittels Glasperlen aufgeschlossen und der Chl *a* Gehalt des Zellextraktes bestimmt. Die Immunodetektion der NblA-Proteine erfolgte mit dem, auf 2,5 µg Chl *a* eingestellten, löslichen Teil des Zellextraktes, dessen Proteine mittels SDS-PAGE separiert und im Anschluss auf eine Nitrocellulosemembran transferiert wurden, durch einen Mix aus NblA1- und NblA2-Antikörper.

2.4.3.2 Messungen der NblA1/NblA2 Heterodimerisierung mittels FRET

Die *in vivo*-Untersuchung der Dimerisierung von NblA1 und NblA2 durch Detektion des FRET-Signals erfolgte in der NblA1_YFP, NblA2_Cer-Mutante. Um verfälschte Ergebnisse in den FRET-Messungen durch Anregung von YFP oder „Durchbluten“ der Cer-Emission auszuschließen, wurden zusätzlich die Mutanten NblA1_YFP, NblA2 und NblA1, NblA2_Cer als Negativkontrollen mitgeführt. Alle drei Varianten waren, wie in Abschnitt 2.4.3.1 gezeigt, durch die Expression der verschiedenen NblA1/NblA2-Proteine *in trans* in der Lage den Abbau der PBS zu induzieren. Zusätzlich wurde die NblA2_YFP, NblA2_Cer $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante verwendet, damit ein unspezifisches FRET-Signal durch zufälligen Energietransfer von Cer auf YFP ausgeschlossen werden konnte.

Um die Interaktion von NblA1 mit NblA2 durch die Emission von YFP verfolgen zu können, wurde die Expression der NblA-Proteine durch den Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium induziert und die Kulturen direkt im Anschluss, sowie 3, 5, 8 und 24 Stunden danach, bei einer OD_{750nm} von 0,3 im Fluoreszenzspektrometer vermessen. Die Anregung des FRET-Donors Cer erfolgte bei 458 nm und die entstehende Akzeptoremission von YFP wurde zwischen 500-600 nm detektiert. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 2.10 dargestellt.

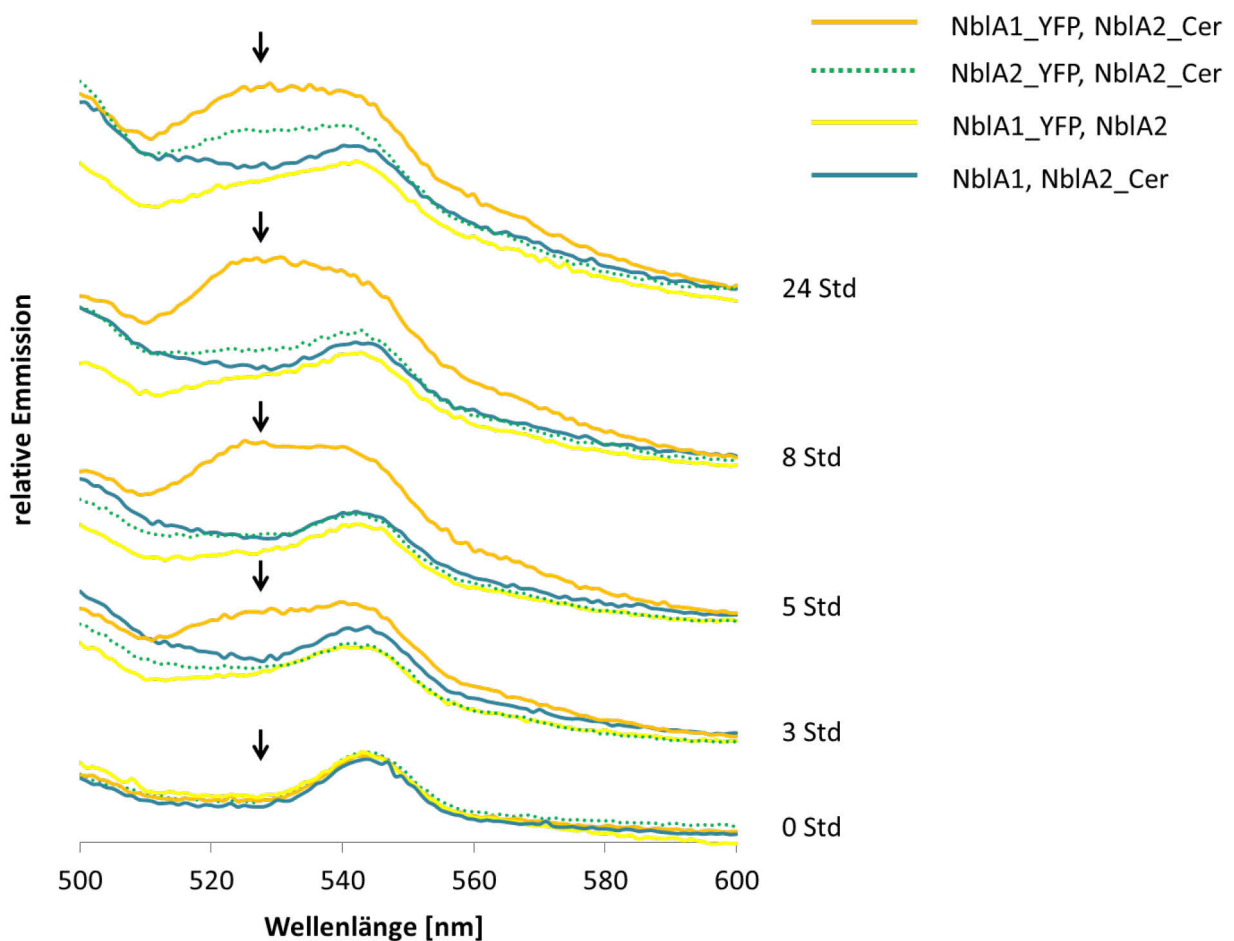


Abbildung 2.10: Untersuchungen zur Dimerisierung von NbIA1 und NbIA2 anhand der FRET-bedingten YFP-Emission. Die Expression der NbIA-Varianten erfolgte durch den Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium. Die Proben wurden direkt nach dem Entzug (0), sowie 3, 5, 8 und 24 Stunden später entnommen. Für die Aufnahme der Emissionsspektren der Mutanten wurden 3 ml Zellkultur (OD_{750} von 0,3) verwendet, die Anregung von Cer erfolgte bei einer Wellenlänge von 458 nm und die Emission von YFP wurde in einem Bereich von 500-600 nm detektiert.

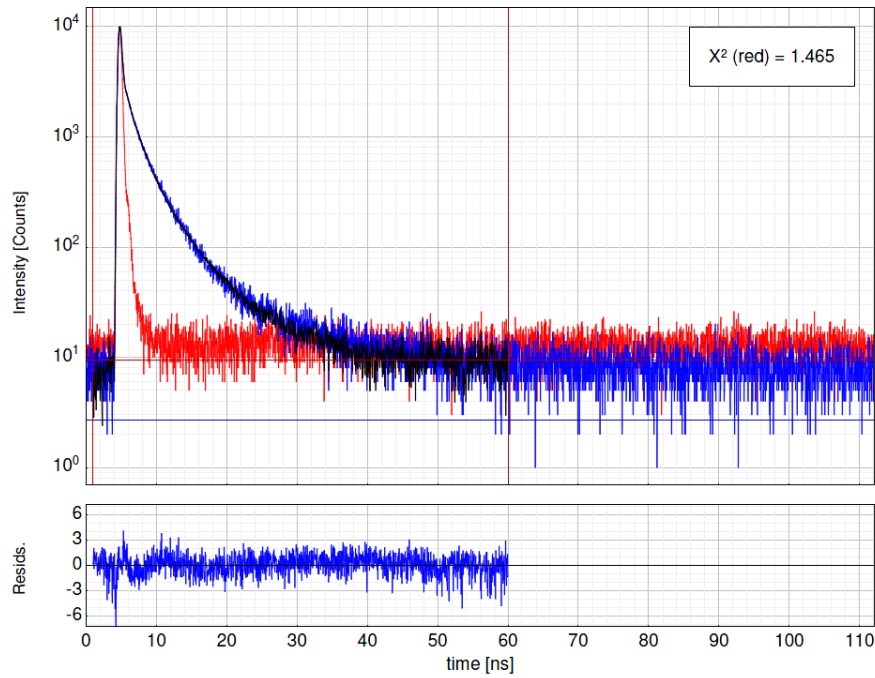
Betrachtet man die Emissionsspektren direkt nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium (0 Std) sind keine Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten feststellbar. Jedoch ist ein Emissionspeak im Bereich von 535-550 nm auffällig. Dieser Peak, der auch im Wildtyp detektiert werden kann (nicht gezeigt) beruht auf der natürlichen Eigenfluoreszenz der *Synechocystis* 6803 Zellen und ist deshalb zu vernachlässigen. Ein FRET-Signal, beruhend auf der Übertragung durch Energie vom Donor Cer auf den Akzeptor YFP, ist erstmalig nach dreistündiger Stickstoffdepletion in der NbIA1_YFP, NbIA2_Cer-Mutante zu beobachten. Die Akzeptoremission nimmt dann bis acht Stunden nach dem Entzug von Stickstoff aus dem Medium weiter zu und fällt nach 24 Stunden wieder ab. Die Zunahme des Signals im Zeitverlauf stimmt dabei mit den Ergebnissen des Immunoblots (Abbildung 2.9 B) überein. Betrachtet man die Kontrollen, in denen jeweils nur ein Fluorophor mit NbIA1, bzw. NbIA2 fusioniert ist, kann keine YFP-Emission festgestellt werden. Demzufolge ist das FRET-Signal der NbIA1_YFP, NbIA2_Cer-Mutante nicht die Folge einer unspezifischen Anregung von YFP bzw. einer verschobenen Emission von Cer. Auch die NbIA2_YFP,

NbIA2_Cer-Mutante zeigt innerhalb der ersten 8 Stunden unter Stickstoffmangelbedingungen keinen signifikanten Anstieg der Akzeptorfluoreszenz, es ist jedoch ein leichter Anstieg der Emission bei 530 nm nach 24 Stunden feststellbar. Da ein messbares FRET-Signal erst nach 24 Stunden auftritt, obwohl die höchste Konzentration an Cer und YFP nach 5-8 Stunden erreicht ist (Abbildung 2.9 B), kann eine zufällige Energieübertragung zwischen Donor Cer und Akzeptor YFP ausgeschlossen werden. Eher deutet die nach 24 Stunden ansteigende Akzeptoremission auf die Ausbildung eines NbIA2-Homodimers hin.

Die durchgeführten Fluoreszenzmessungen zeigen eine eindeutige Interaktion zwischen NbIA1 und NbIA2 und eine Korrelation der Intensität des FRET-Signals mit der Zunahme der NbIA1_YFP- und NbIA2_Cer-Konzentration in den Zellen.

Um die erhaltenen Ergebnisse und die hier etablierte Fluoreszenzspektroskopie für Interaktionsanalysen durch ein FRET-Signal in Cyanobakterien zu bestätigen, wurden neben den *steady state*-Messungen auch zeitaufgelöste Messungen durchgeführt. Hierbei wurde das Fluorophor Cer mit Laserpulsen angeregt. Diese Laserpulse sind kürzer als das Abklingen des Fluoreszenzsignals (*decay*). Sie machen es dadurch möglich das Abklingen des Emissionssignals über die Zeit zu verfolgen und somit die Lebenszeit von Cer zu bestimmen. Die Messungen der Lebenszeit wurden spektroskopisch durchgeführt, wobei die Lebenszeit von Cer in Anwesenheit und Abwesenheit des Akzeptors YFP bestimmt wurde. Da nach 8 Stunden Stickstoffdepletion die höchste Expression bzw. höchste gemessene Emission des FRET-Paares (Abbildung 2.10) vorlag, erfolgten die Lebenszeitmessungen zu diesem Zeitpunkt, um ein möglichst starkes Signal zu erhalten.

Die Bestimmung der Lebenszeit von Cer erfolgte durch Anregung bei 475 nm mithilfe einer Pulsaserdiode und die emittierten Photonen wurden durch eine Photodiode detektiert. Um das Rauschen durch die natürliche Fluoreszenz der Cyanobakterien zu minimieren, wurde bei den Messungen ein optischer Bandpass-Filter (470 ± 15 nm) verwendet. Da nur ein Photon pro 100 Laserpulse (1 *count*) registriert wird, wurden die Messungen bis zu einer Detektion von 1.0000 *counts* wiederholt und die gemessene Zeitdifferenz in ein Diagramm aufgetragen. Jede Messung erfolgte aus statistischen Gründen sieben Mal, alle sieben Messungen wurden anschließend zusammengefasst. Dafür wurden die einzelnen Kurven nach der nichtlinearen Methode der Kleinsten Quadrate (Abbildung 2.11 A) (Fluofit-PicoQuant) mit zwei exponentiellen Termini gefittet. In das Fitting wurde außerdem die „Responsefunktion“ des Gerätes (*instrument response function*-IRF) mit einbezogen. Anhand der erhaltenen Kurve (Abbildung 2.11 A) konnte die amplitudengewichtete Lebenszeit (τ_{AV}) mithilfe der Formel $\bar{\tau} = \sum_i a_i \tau_i$ berechnet werden.

A

$$I(t) = \int_{-\infty}^t IRF(t') \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} dt'$$

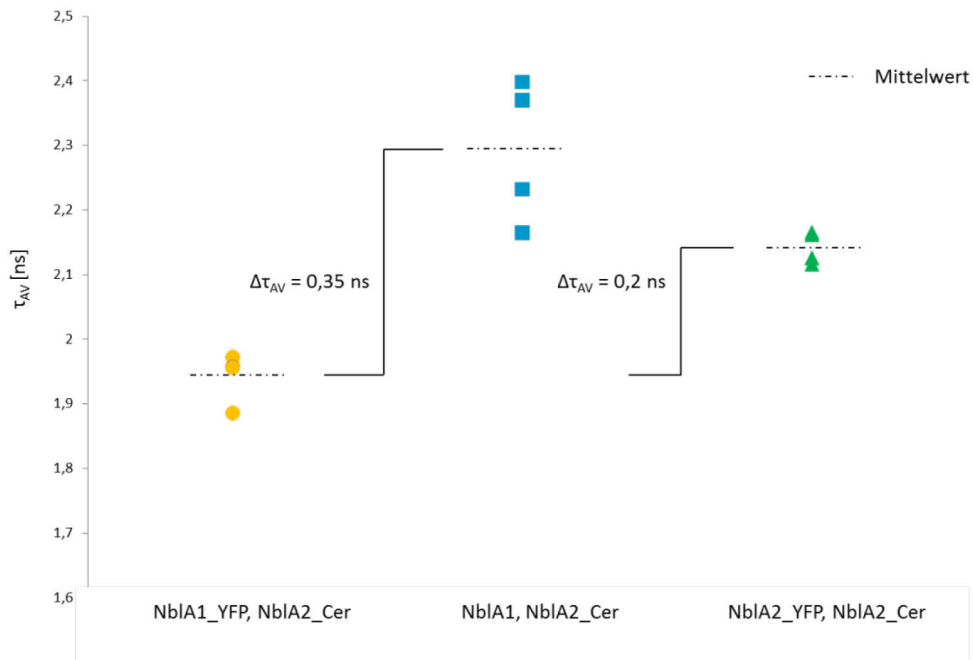
B

Abbildung 2.11: Bestimmung der Lebenszeit von Cer. **A:** Exemplarisches Histogramm der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung im Fluoreszenz-(Lebenszeit-)Spektrometer. Dargestellt ist das Histogramm der Photonenzählung mit der IRF (*instrument response function*) in rot und der mit zwei exponentiellen Termini gefitteten Lebenszeit von Cer in blau. **B:** Amplitudengewichtete Lebenszeit von Cer. Dargestellt sind die, nach der nichtlinearen Methode der kleinsten Quadrate über zwei exponentielle Termini gefitteten, amplitudengewichteten Lebenszeiten. Jeder Punkt stellt die Zusammenfassung von sieben nacheinander durchgeführten Lebenszeitmessungen einer Probe dar. Vermessen wurden die $\Delta nblA1/nblA2$ *Synechocystis* 6803-Mutanten NblA1_YFP, NblA2_Cer; NblA1, NblA2_Cer und NblA_YFP, NblA2_Cer 8 Stunden nach dem Entzug von Stickstoff aus dem Medium bei einer OD_{750} von 0,3.

Die Ergebnisse von vier unabhängig durchgeführten Messungen der Cer-Lebenszeit der drei Mutanten sind in Abbildung 2.11 B dargestellt. Die mittlere amplitudengewichtete Lebenszeit von NblA2_Cer in Abwesenheit eines Fluoreszenzakzeptors konnte mit 2,3 ns bestimmt werden, was den Literaturdaten für Cer entspricht [203]. Durch Anwesenheit des Akzeptors NblA1_YFP verringerte sich die mittlere Lebenszeit um 0,35 ns auf 1,9 ns. Um sicherzugehen, dass die verkürzte Lebenszeit die Ursache einer Interaktion zwischen NblA1 und NblA2 ist, wurde zusätzlich die Lebenszeit von Cer aus der NblA2_YFP, NblA2_Cer-Mutante bestimmt. Wie schon gezeigt werden konnte, werden beide Fusionsproteine nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium exprimiert (Abbildung 2.9), zeigen jedoch nach 8 Stunden unter Stickstoffmangelbedingungen laut Emissionsspektren (Abbildung 2.10) keine Interaktion. Die ermittelte mittlere amplitudengewichtete Lebenszeit von Cer fiel bei den Messungen mit 2,1 ns geringer aus, als bei der Expression von NblA2-Cer ohne Fluoreszenzakzeptor YFP. Jedoch verkürzte sich die Lebenszeit nicht in dem Maße, wie es für NblA1_YFP, NblA2_Cer gezeigt werden konnte. Werden die Fluorophore also beide mit NblA2 fusioniert exprimiert, kommt es zwar zu einer Verkürzung der Lebenszeit, diese fällt aber mit einem $\Delta \tau_{AV}$ von 0,15 ns wesentlich geringer aus, als bei der Expression von NblA1 und NblA2 als Fluorophorfusionsprotein ($\Delta \tau_{AV}$ von 0,35 ns). Dieses schwächere Signal kann verschiedene Ursachen haben, so ist ein unspezifischer Energietransfer vom Donor auf Akzeptor denkbar (Rauschen), wahrscheinlicher ist jedoch eine schwache NblA2-Homodimerbildung. Geht man davon aus, dass die verkürzte Lebenszeit in der Kontrolle auf einen zufälligen Energietransfer zurückzuführen ist, muss dieser Wert in den Messungen beachtet werden. Bezieht man also die Verkürzung der Lebenszeit in der Kontrolle als Rauschen in die Messung mit ein, kommt man auf eine Verkürzung der Lebenszeit von 0,2 ns, was immer noch einem signifikanten Wert entspricht.

Die Expression von NblA1_YFP und NblA2_Cer im Vergleich zur Expression von NblA1, NblA2_Cer führt demnach zu einer Verkürzung der Lebenszeit von Cer. Ursache dafür ist die Interaktion von NblA1 und NblA2, die die Fluorophore in die erforderliche räumliche Nähe zueinander bringen. Somit bestätigen die Lebenszeitdaten von Cer die schon beschriebenen Fluoreszenzmessungen. Die *steady state*- und die zeitaufgelösten FRET-Messungen zeigen demnach eindeutig, dass NblA1 und NblA2 *in vivo* ein Heterodimer bilden, weiterhin offen bleibt jedoch die Frage nach dessen Funktion.

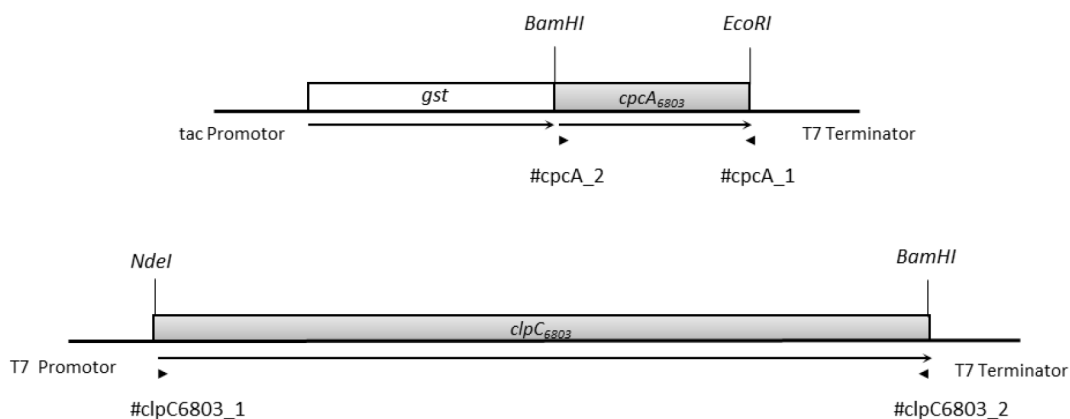
2.4.4 Interaktion von NblA1 und NblA2 mit ClpC₆₈₀₃ und den PBP

Hinweise auf die Funktion des NblA1/NblA2-Heterodimers liefern die weiter oben beschriebenen Versuche, die *in vitro* eine Interaktion zwischen NblA₇₁₂₀ und ClpC₆₈₀₃ (Abschnitt 2.2.1) sowie *in vivo* eine Komplementation des nicht bleichenden Phänotyps der $\Delta nblA1/nblA2$ *Synechocystis* 6803-Mutante durch NblA₇₁₂₀ (Abschnitt 2.3.1) zeigen. Das NblA1/NblA2-Heterodimer übernimmt demnach aller Wahrscheinlichkeit nach wie NblA₇₁₂₀ die Funktion eines Adapterproteins, in dem es

an die PBS und ClpC bindet, diese in räumliche Nähe bringt und so den PBS-Abbau induziert. Um diesen ternären Komplex nachzuweisen, wurden *in vitro-pulldown*-Experimente durchgeführt. Dabei wurde auf einen Versuch zurückgegriffen, durch den schon in *Nostoc* 7120 die PBP und ClpC₇₁₂₀ als Interaktionspartner von NblA₇₁₂₀ nachgewiesen werden konnten [187]. Der Gedanke des Versuches war, sich die Eigenschaft von NblA zu Nutze zu machen, gleichzeitig an ClpC und α -PC zu binden und alle drei Proteine über einen Affinitäts-Tag zu eluieren.

Für die Versuche wurde in *E. coli* exprimiertes GST-CpcA an Glutathion-Agarose immobilisiert und in zwei Ansätze aufgeteilt. Beide Aliquots wurden mit *E. coli*-Zellextrakt aus Zellen, die ClpC₆₈₀₃ exprimierten, inkubiert. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von gereinigtem NblA1/His-NblA2-Protein in einen der beiden Ansätze. Um die Hexamerisierung von ClpC₆₈₀₃ zu gewährleisten wurden dem Ansatz 5 mM Mg-ATP zugesetzt. Nach dem Entfernen von nicht gebundenem Protein durch mehrere Waschschrte, wurden die Proteine eluiert und mithilfe einer SDS-PAGE separiert. In einem zweiten Versuch wurde das über Glutathion-Agarose und PreScission®-Protease-Verdau gereinigte Heterodimer NblA1/His-NblA2 an Ni-IDA-Resins immobilisiert und in drei Ansätze aufgeteilt. Jeder der Ansätze wurde mit rekombinanten ClpC₆₈₀₃ enthaltenden löslichen Zellextrakt von *E. coli* inkubiert und zwei der drei Ansätze wurde zusätzlich Mg-ATP beigefügt. Nach dem Entfernen nicht gebundener Proteine wurden zwei Aliquots (ein Ansatz mit ATP und einer ohne) mit löslichem Zellextrakt von *Synechocystis* 6803 inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden im Anschluss durch Waschen entfernt, gebundene Proteine eluiert und mithilfe einer SDS-PAGE analysiert.

A



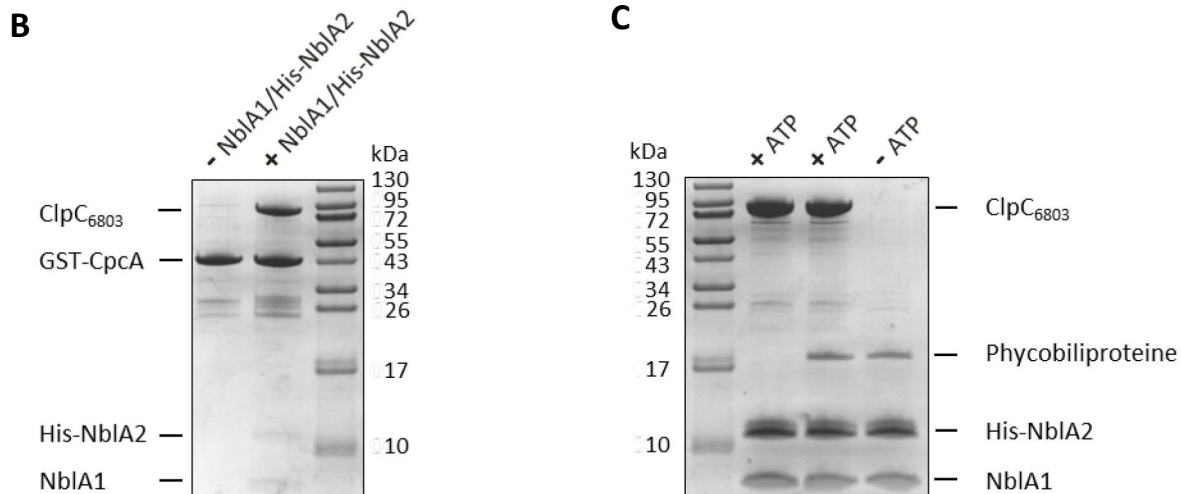


Abbildung 2.12: Das Heterodimer NblA1/NblA2 interagiert mit ClpC und PBP. **A:** Schematische Ausschnitt der konstruierten Plasmide. Die Lage der für die Konstruktion eingesetzten Primer ist mit Pfeilen markiert. Die in den Klonierungen verwendeten Restriktionsorte sind gekennzeichnet. **B:** *In vitro-pulldown*-Analyse - das Heterodimer NblA1/His-NblA2 interagiert mit heterolog exprimierten GST-CpcA und ClpC₆₈₀₃. Zunächst wurde gereinigtes GST-CpcA an Glutathion-Agarose immobilisiert und gleichmäßig auf zwei Ansätze verteilt. Beide Ansätze wurden mit *E. coli*-Zellextrakt aus Zellen, die ClpC₆₈₀₃ heterolog exprimierten, inkubiert. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von Mg-ATP und in einem der beiden Ansätze die Zugabe von gereinigtem NblA1/His-NblA2. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden nicht gebundene Proteine durch mehrere Waschschrte entfernt und gebundene Proteine mit glutathionhaltigem Elutionspuffer eluiert. Die eluierten Proteine wurden durch eine DOC/TCA-Fällung konzentriert, mittels SDS-PAGE separiert und mit Coomassie angefärbt. **C:** *In vitro-pulldown*-Analyse - NblA1/His-NblA2 interagiert mit heterolog exprimierten ClpC₆₈₀₃ und PBP aus löslichem *Synechocystis* 6803-Zellextrakt. NblA1/His-NblA2 wurde an Ni-Ida-Resins immobilisiert und in drei Aliquots geteilt. Alle drei Ansätze wurden mit löslichem Zellextrakt von *E. coli*, der heterolog exprimiertes ClpC₆₈₀₃ enthielt, in An- (2 Proben) oder Abwesenheit (1 Probe) von 5 mM ATP in Tris-Puffer C inkubiert. Nach dem Entfernen nicht gebundener Proteine durch Waschen, wurden zwei Aliquots (ein Ansatz mit ATP und einer ohne) mit löslichem Rohextrakt von *Synechocystis* 6803 inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden durch mehrere Waschschrte entfernt, gebundene Proteine durch imidazolhaltigen Elutionspuffer eluiert und mithilfe einer SDS-PAGE analysiert.

In Abbildung 2.12 B sind die Ergebnisse der Interaktionsanalyse mit dem mit GST fusionierten Apoprotein von α -PC aufgeführt. Der Versuch zeigt, dass nur in Anwesenheit von NblA1 und NblA2 eine Kopräzipitation von ClpC₆₈₀₃ erfolgt. Ist kein NblA-Heterodimer vorhanden, wird auch kein ClpC₆₈₀₃ mitgereinigt. Das gleiche Ergebnis kann auch in Abbildung 2.12 C beobachtet werden. Hier konnten durch das an Ni-IDA-Resins gebundene Heterodimer NblA1/His-NblA2 ClpC₆₈₀₃ und PBP kopräzipitiert werden. Der Versuch zeigt außerdem, dass die Bindung von ClpC₆₈₀₃ bzw. den PBP unabhängig voneinander an NblA1/NblA2 erfolgt. Erkennbar ist dies daran, dass ClpC₆₈₀₃ und NblA1/His-NblA2 ohne die Zugabe von PBP interagieren (Spur 2) bzw. das Heterodimer in Abwesenheit von funktionellem ClpC₆₈₀₃ an die PBP bindet (Spur 4).

Die *in vitro-pulldown*-Versuche zeigen, dass das NblA-Heterodimer aus *Synechocystis* 69803 mit ClpC₆₈₀₃ und PBP interagiert.

2.4.5 NblA1 interagiert ohne NblA2 mit den PBP und ClpC₆₈₀₃

Offen bleibt die Frage, ob ein NblA ClpC₆₈₀₃ und das andere die Bindung an die PBP vermittelt, beide NblA-Proteine an beide Interaktionspartner binden, oder eventuell nur eines der beiden Proteine die Bindung vermittelt und das andere eine noch unbekannte Aufgabe übernimmt. Diese Fragestellung

sollte durch *in vitro*-pulldown-Versuche geklärt werden. Zunächst wurde untersucht, ob NblA1 und NblA2 mit ClpC₆₈₀₃ interagieren. Dafür wurden rekombinant erzeugtes NblA1-GST bzw. NblA2-GST (Abbildung 2.13 A) an Glutathion-Agarose immobilisiert. Die beladene Glutathion-Agarose wurde mit löslichem Zellextrakt aus *E. coli*, der heterolog exprimiertes ClpC₆₈₀₃ enthielt, und Mg-ATP inkubiert. Im Anschluss wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen entfernt, die gebundenen Proteine durch glutathionhaltigen Elutionspuffer eluiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 2.13 A dargestellt und zeigt eine Interaktion von ClpC₆₈₀₃ mit NblA1-GST. Wohingegen eine Interaktion von NblA2-GST mit ClpC₆₈₀₃ nicht beobachtet werden kann.

In einem weiteren Versuch wurde die Interaktion von NblA1 und NblA2 mit α -PC untersucht. Dafür wurde GST-CpcA an Glutathion-Agarose immobilisiert und in zwei Aliquots aufgeteilt. Beide Ansätze wurden mit Mg-ATP und *E. coli*-Zellextrakt, der heterolog exprimiertes ClpC₆₈₀₃ enthielt, inkubiert. Zusätzlich wurde einem Aliquot rekombinantes NblA1 und dem anderen Ansatz rekombinantes NblA2 zugefügt, wobei beide NblA-Proteine im Vorfeld als GST-Fusionsproteine an Glutathion-Agarose gereinigt und anschließend durch Zugabe von PreScission®-Protease von ihrem Affinitäts-Tag befreit und eluiert wurden. Nach der Inkubation der Ansätze wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen entfernt. Die Elution erfolgte mit glutathionhaltigem Elutionspuffer und die Analyse der gebundenen Proteine mittels einer SDS-PAGE.

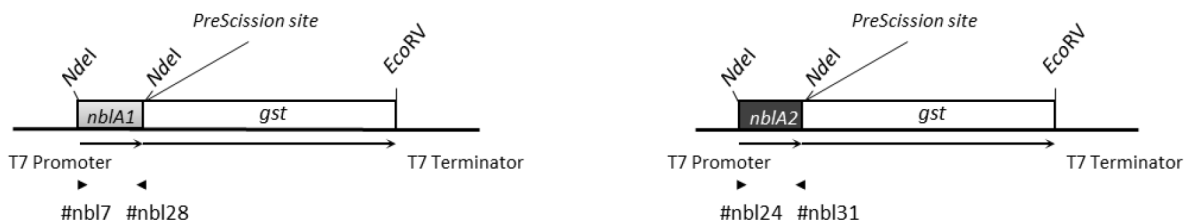
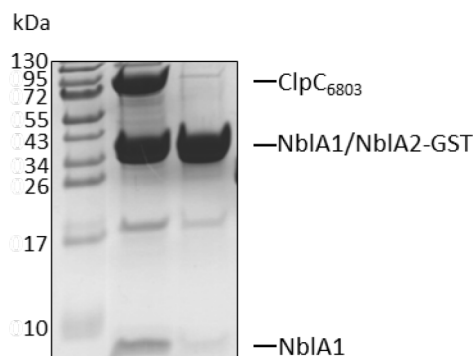
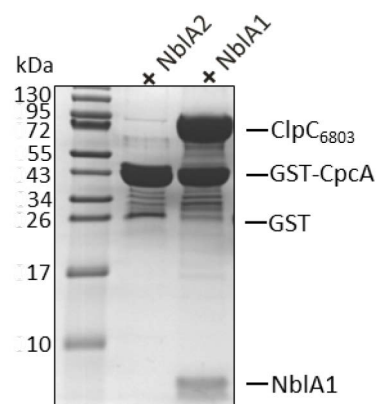
A**B****C**

Abbildung 2.13: NblA1 interagiert mit PBP und ClpC₆₈₀₃. **A:** Schematischer Ausschnitt der konstruierten Plasmide. Die Lage der für die Konstruktion eingesetzten Primer ist mit Pfeilen markiert und die im Rahmen der Klonierungen verwendeten Restriktionsorte sind gekennzeichnet. **B:** *In vitro*-pulldown-Analyse - NblA1-GST interagiert in Anwesenheit von Mg-ATP mit heterolog exprimiertem ClpC₆₈₀₃. Zunächst wurde gereinigtes GST-NblA1 bzw. GST-NblA2 an Glutathion-Agarose immobilisiert. Beide Ansätze wurden mit löslichem *E. coli*-Zellextrakt aus Zellen, die ClpC₆₈₀₃ heterolog exprimierten,

inkubiert. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von Mg-ATP. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden nicht gebundene Proteine durch mehrere Waschschrte entfernt und gebundene Proteine mit glutathionhaltigem Elutionspuffer eluiert. Die eluierten Proteine wurden durch eine DOC/TCA-Fällung konzentriert, mittels SDS-PAGE separiert und mit Coomassie anfärbt. **C:** *In vitro-pulldown*-Analyse – NblA1 bildet mit GST-CpcA und ClpC₆₈₀₃ einen trimeren Komplex. Heterolog in *E. coli* exprimiertes und gereinigtes GST-CpcA wurde an Glutathion-Agarose immobilisiert und in zwei Aliquots aufgeteilt. Beide Ansätze wurden mit Mg-ATP und *E. coli*-Zellextrakt, der heterolog exprimiertes ClpC enthielt, inkubiert. Zusätzlich wurde einem Aliquot gereinigtes, rekombinantes NblA1 und dem anderen Ansatz gereinigtes, rekombinantes NblA2 zugefügt. Im Anschluss wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen entfernt, die gebundenen Proteine durch glutathionhaltigen Elutionspuffer eluiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

Das Ergebnis des Interaktionsversuches ist in Abbildung 2.13 C dargestellt. Es ist ersichtlich, dass nur in Anwesenheit von NblA1 ein Komplex aus ClpC₆₈₀₃, NblA1 und GST-CpcA nachweisbar ist. Wohingegen bei der Inkubation mit NblA2 nur NblA2 im Eluat enthalten ist. Demzufolge bindet NblA1 an PBP und ClpC₆₈₀₃ wohingegen NblA2 *in vitro* an keines der beiden Proteine bindet. Die Ausbildung des ternären Komplexes scheint *in vitro* NblA1 vorbehalten, wobei die Ausbildung eines Heterodimers nicht notwendig ist.

2.5 Untersuchungen zum NblA-induzierten Abbau der PBS durch eine Clp-Protease

Die zuvor dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das Heterodimer die biologisch aktive Form von NblA1 und NblA2 darstellt und dieses *in vitro* mit ClpC₆₈₀₃ und den PBP interagiert. NblA1/NblA2 bringt als Linker ClpC₆₈₀₃ und die PBS in räumliche Nähe und induziert so den Abbau der Lichtsammelkomplexe. Der genaue Mechanismus des Abbauprozesses bleibt jedoch offen. Um das aufgestellte Modell des NblA-induzierten Abbaus der PBS durch eine Clp-Protease zu verifizieren, sollte der PBS-Abbau *in vitro* nachempfunden werden.

2.5.1 Identifizierung der Clp-Homologe aus *Synechocystis* 6803

Wie unter Punkt 1.2.1 der Einleitung beschrieben, besitzen Cyanobakterien, im Gegensatz zu nicht Photobionten, mehrere, unterschiedlich aufgebaute Clp-Proteasen. Untersuchungen über die Aufgabe und Funktionalität der Gene in Cyanobakterien wurden bis jetzt allerdings nur in *Synechococcus* 7942 durch die Arbeitsgruppe um Adrian Clarke angestellt [33, 34, 205, 206]. Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe zeigen als wahrscheinlichste Protease für den Abbau der PBS die putative ClpC₆₈₀₃-ClpP1/ClpR-Protease auf. Da in *Synechococcus* 7942 jedoch auch gezeigt werden konnte, dass bei einer Deletion des *clpP1*-Gens in der $\Delta clpP1$ -Mutante ein Teil des ClpP3-Proteins in der Membranfraktion zu finden ist [33], scheint es möglich, dass beide mit ClpC assoziierten Kernkomplexe (ClpP1/ClpR und ClpP3/ClpR) die Aufgabe des PBS-Abbaus übernehmen können. Aus diesem Grund sollten beide Clp-Proteasen rekombinant erzeugt und auf ihre Fähigkeit NblA und PBS abzubauen, überprüft werden.

Die Homologe der in *Synechococcus* 7942 untersuchten Clp-Proteasen wurden mithilfe einer BLAST(*Basic Local Alignment Search Tool*)-Analyse identifiziert. Die Sequenzen der identifizierten

Gene wurden der Cyanobase (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>) entnommen. Dabei fiel auf, dass nicht alle aufgeführten *clp*-Gene für *Synechocystis* 6803 in der Cyanobase korrekt annotiert wurden (Stand: Mai 2013). Identifiziert wurden das Genprodukt des ORF *slr0164* als *clpR* (in der Cyanobase als *clpP4* annotiert), *slr0162* als *clpP3* (in der Cyanobase als *clpP3* annotiert), *slr0542* als *clpP1* (annotiert als *clpP*) und *slr0543* als *clpP2* (in der Cyanobase als *clpP2* annotiert).

Um Rückschlüsse auf die Ähnlichkeit der Homologe ziehen zu können, wurden die Aminosäuresequenzen der identifizierten Proteine durch ein paarweises Alignment mit den entsprechenden Homologen aus *Synechococcus* 7942 verglichen. Der Aminosäuresequenzvergleich zeigte eine hohe Identität aller vier Clp-Proteine zwischen *Synechococcus* 7942 und *Synechocystis* 6803 (Abbildung 2.14). Die große Identität der Proteine lässt auf eine ähnliche Funktion schließen. Demnach besteht eine große Wahrscheinlichkeit, dass die in *Synechococcus* 7942 identifizierten Clp-Proteasen auch in *Synechocystis* 6803 ähnliche Aufgaben übernehmen.

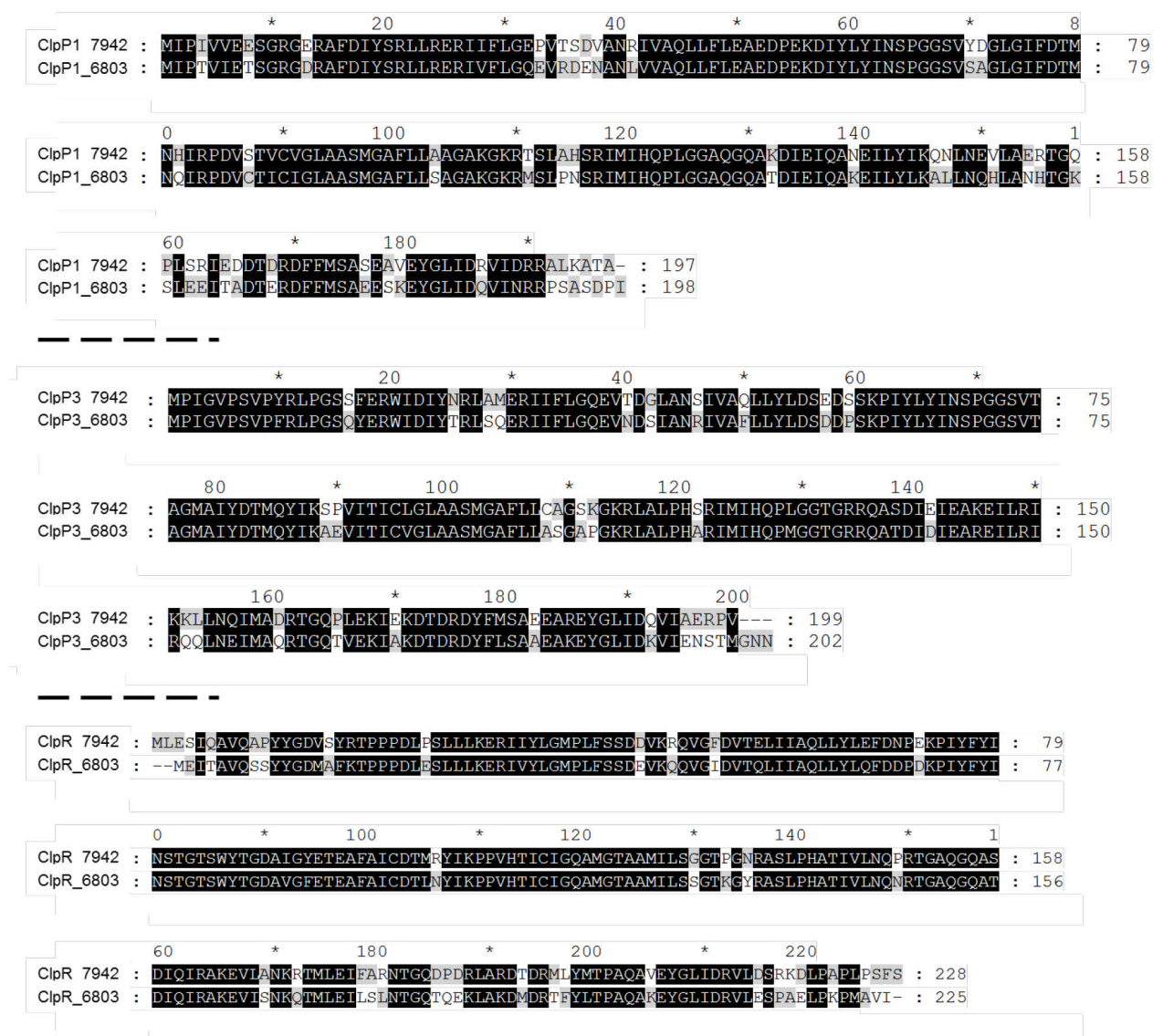


Abbildung 2.14: Sequenzalignment der proteolytischen Untereinheiten ClpP1, ClpP3 und ClpR aus *Synechococcus* 7942 und *Synechocystis* 6803. Die verwendeten Sequenzen wurden der Cyanobase entnommen (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>) und die proteolytischen Untereinheiten aus *Synechocystis* 6803 durch eine BLAST-Analyse mithilfe der NCBI-Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) identifiziert. Die Alignments der Clp-Proteine wurden im Anschluss mit dem Programm Clustal Omega erstellt und mittels GeneDoc bearbeitet. Konservierte Aminosäuren sind schwarz unterlegt.

2.5.2 Expression und Reinigung von ClpP1-His/ClpR

Für die Expression der proteolytischen Untereinheiten wurde der pACYC-Duet Vektor verwendet, der die gleichzeitige Expression zweier Proteine ermöglicht (siehe auch Punkt 2.4.2). Für *Synechococcus* 7942 konnte gezeigt werden, dass ClpP3 und ClpR nach der Expression vom pACYC-Duet ein stabiles, Oligomer bilden, das über nur einen Affinitäts-*Tag* gereinigt werden kann [206]. Nach diesem Vorbild wurde auch in *Synechocystis* 6803 nur das *clpP1*-Gen C-terminal mit einem *his*-*Tag* kloniert, während die Expression von ClpR ohne *Tag* erfolgte. Das verwendete Konstrukt ist in Abbildung 2.15 A dargestellt.

Die heterolog in *E. coli* koexprimierten Proteine wurden an Ni-Ida-Resins immobilisiert und nicht gebundene Proteine durch mehrere Waschschrte entfernt. Die Elution der Proteine erfolgte mit imidazolhaltigem Elutionspuffer. Abbildung 2.15 B zeigt den Reinigungsverlauf von ClpP1-His/ClpR. Dabei fällt auf, dass nur eine distinkte Proteinbande nach der Elution der Proteine im SDS-Gel sichtbar ist. Erklärt werden kann dies durch die nahezu gleiche Größe der zwei rekombinanten Clp-Proteine mit 25,2 kDa für ClpP1-His und 24,8 kDa für ClpR, die sich durch eine SDS-PAGE nicht voneinander separieren lassen. Mithilfe einer nativen PAGE und einer Größenausschlusschromatografie wurde deshalb analysiert, ob die eluierten Proteine einen oligomeren Komplex ausbilden, der einem funktionellen proteolytischen Kern entsprechen kann. Um bei der Gelfiltration die Größe des Proteinkomplexes möglichst genau zu bestimmen, wurden die Proteine an einer SuperdexTM75 10/300GL-Säule, sowie einer SuperdexTM200 10/300GL-Säule chromatographiert. Auch der Proteinstandard wurde unter den identischen Versuchsbedingungen an beiden Säulen chromatographiert.

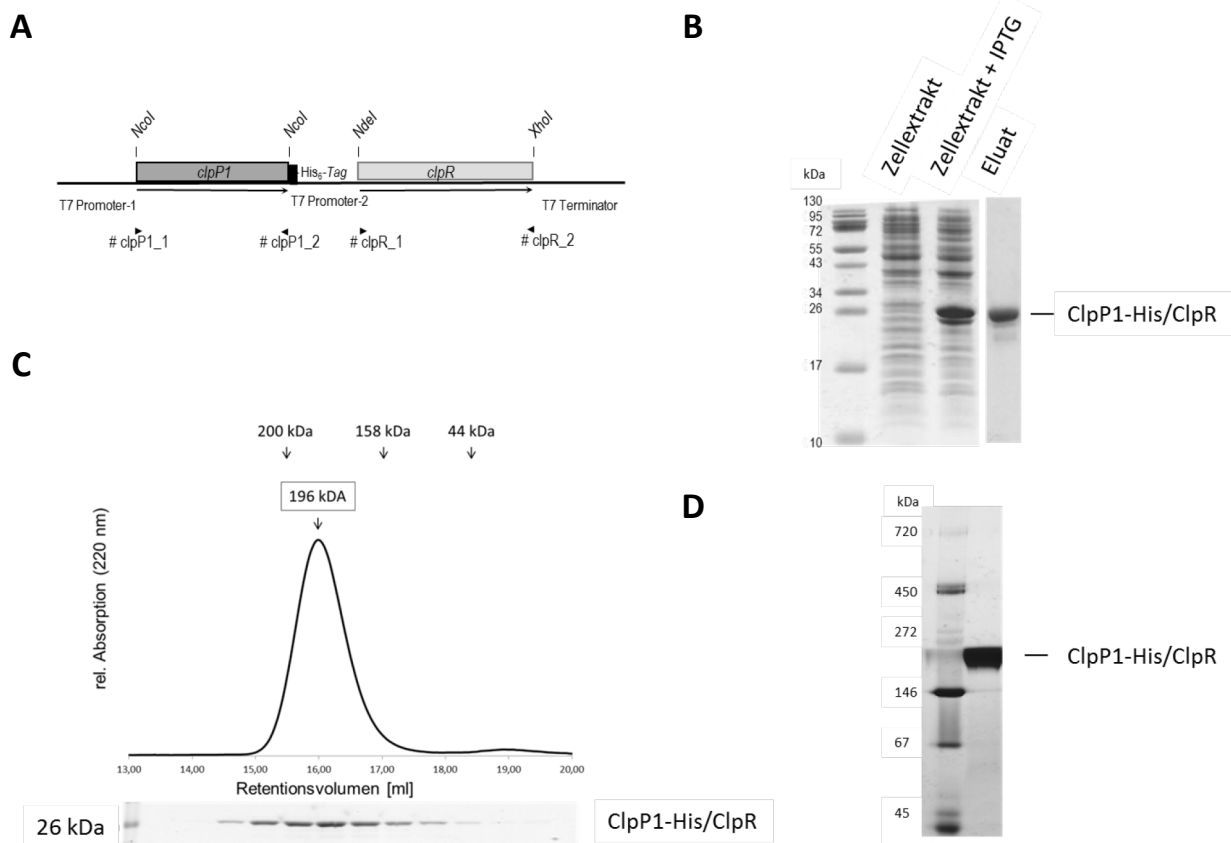


Abbildung 2.15: Heterologe Expression und Reinigung von ClpP1-His/ClpR. **A:** Schematischer Ausschnitt aus den konstruierten Plasmid. Die Lage der für die Konstruktion eingesetzten Primer ist mit Pfeilen markiert und die im Rahmen der Klonierungen verwendeten Restriktionsorte sind im Gen gekennzeichnet. **B:** Expression und Reinigungsverlauf von ClpP1-His/ClpR in *E. coli*. Gezeigt ist der lösliche Zellextrakt der *E. coli*-Zellen vor (Zellextrakt) und nach der Induktion mit IPTG bei 18 °C über Nacht (Zellextrakt + IPTG), sowie ClpP1-His/ClpR nach der Reinigung an Ni-Ida-Resins und der Elution mit imidazolhaltigem Elutionspuffer. **C:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatografie von ClpP1-His/ClpR an einer Superdex™75 10/300GL-Säule. Die Elution der Proteine wurde durch Absorptionsmessung bei 220 nm detektiert. Die Proteine des in 500 µl Fraktionen gesammelten Eluats wurden durch DOC-TCA-Fällung konzentriert und mithilfe einer SDS-PAGE analysiert. Die Größe der eluierten Proteinkomplexe wurde durch die Größen von Standardproteinen, die unter den gleichen Versuchsbedingungen aufgetrennt wurden, ermittelt. **D:** Native Gelelektrophorese des ClpP1-His/ClpR-Komplexes. 20 µg ClpP1-His/ClpR-Protein wurden durch eine native Gelelektrophorese (ServaGel™N 4-16) ihrer Größe entsprechend aufgetrennt.

In Abbildung 2.15 C ist exemplarisch das Elutionsprofil des Superdex™75 10/300GL-Säulenlaufes dargestellt. Das Chromatogramm zeigt die Elution beider Clp-Proteine in einem Elutionspeak. Das anhand beider Säulenläufe und der aufgetrennten Markerproteine errechnete Molekulargewicht des Komplexes betrug 196 kDa. Ein ähnliches Ergebnis ergab auch die native PAGE (Abbildung 2.15). Hier wurden 20 µg der eluierten Proteine auf ein natives Gradientengel (ServaGel™N 4-16) aufgetragen und zusammen mit einem Proteinstandard durch Anlegung einer Spannung entsprechend des Molekulargewichts aufgetrennt. Auch hier ist eine distinkte Proteinbande mit einer Größe von ca. 200 kDa zu erkennen. Die Größe des Oligomers liegt demnach zwischen der errechneten Größe eines heptameren und eines oktameren Komplexes. Das Heptamer ist in allen charakterisierten Clp-Proteasen die funktionelle Einheit des proteolytischen Kerns [33, 206, 207], demzufolge sprechen

die Ergebnisse dafür, dass ClpP1-His und ClpR assemblieren und gemeinsam den proteolytischen Kern einer Clp-Protease bilden.

2.5.3 Ist der proteolytische Komplex aus ClpC₆₈₀₃-ClpP1-His/ClpR funktionell?

Um die Funktionalität der rekombinanten Proteine nachzuweisen, wurde die proteolytische Aktivität der Protease untersucht. Dabei war zu beachten, dass eine funktionelle Clp-Protease neben dem heptameren, proteolytischen Kern den Chaperonpartner erfordert, der für die Substraterkennung und Entfaltung des Substrats verantwortlich ist. Im Falle der putativen ClpP1/ClpR-Protease wird als Chaperonpartner ClpC₆₈₀₃ angenommen, sodass für die Versuche neben ClpP1-His/ClpR rekombinant erzeugtes His-ClpC₆₈₀₃ (schematische Darstellung des Konstrukts in Abbildung 2.2 A) eingesetzt wurde.

Die Aktivität der Clp-Protease wurde anhand ihrer Fähigkeit ein Modellsubstrat zu degradieren nachgewiesen. Als Substrat diente α -Casein, ein Protein der Kuhmilch, dass durch seine exponierten, hydrophoben Aminosäuren auf der Proteinoberfläche ein gebräuchliches, unspezifisches Substrat für Clp-Proteasen darstellt [206, 208] .

Für den Versuch wurde gereinigtes ClpC₆₈₀₃ zusammen mit ClpP1-His/ClpR und α -Casein inkubiert. Da für die Hexamerisierung von ClpC₆₈₀₃ und die Entfaltung sowie Translokation des Substrates eine große Menge ATP notwendig war, wurde ATP durch ein Regenerationssystem in ausreichendem Maße bereitgestellt. Die Aktivität der Protease wurde durch die abnehmende Konzentration des α -Caseins im Ansatz bestimmt. Dazu wurden direkt nach dem Starten der Reaktion, durch Zugabe von ATP, sowie nach 2, 5, 7 und 10 Minuten Proben aus dem Ansatz entnommen und die Reaktion durch Zugabe eines SDS-Probenpuffers gestoppt. Die α -Casein-Konzentration wurde anschließend durch eine SDS-PAGE analysiert.

Um auszuschließen, dass alleinig ClpP1-His einen funktionellen, heptameren Komplex bildet, wurde ClpP1-His zusätzlich untersucht. Dazu wurde ClpP1-His ohne ClpR heterolog in *E. coli* exprimiert (Konstrukt siehe Abbildung 2.16 B), gereinigt und ebenfalls wie beschrieben auf seine proteolytische Aktivität hin überprüft.

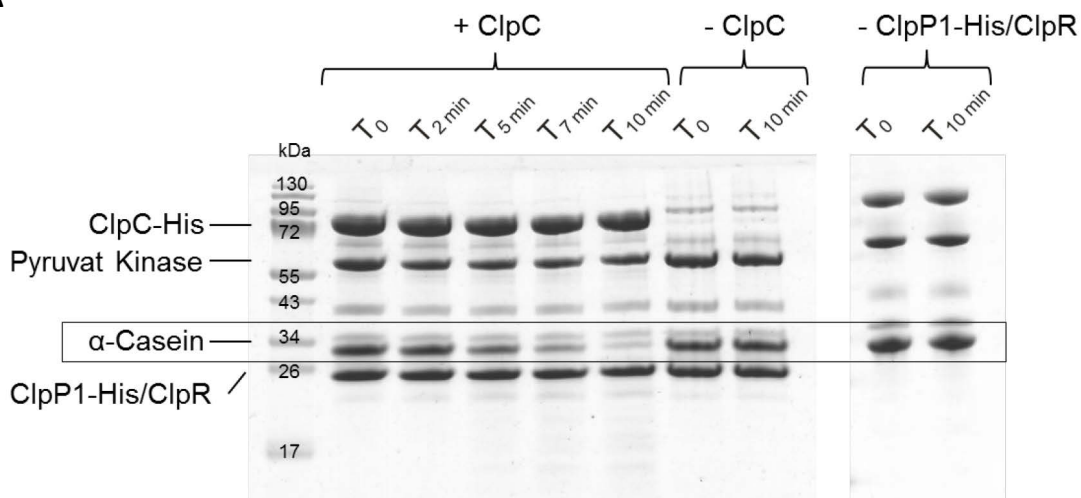
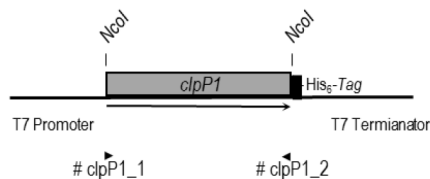
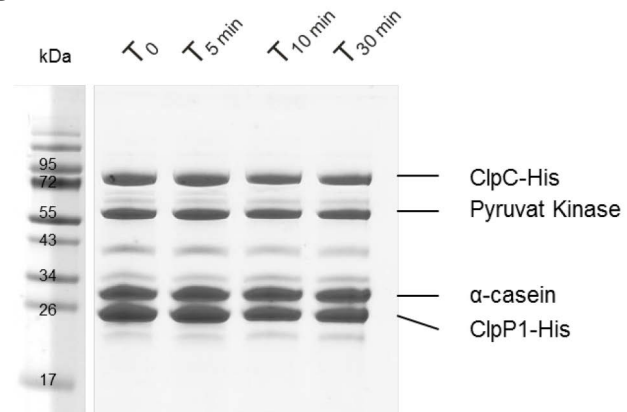
A**B****C**

Abbildung 2.16: ClpC₆₈₀₃-ClpP1-His/ClpR bildet eine funktionelle Clp-Protease. A: α -Casein-Abbau durch die ClpC₆₈₀₃-ClpP1-His/ClpR-Protease. Für den Verdau von α -Casein wurden äquimolare Mengen (2 μ M) der gereinigten Proteine ClpC₆₈₀₃, ClpP1-His/ClpR und α -Casein in TRIS-Puffer C eingesetzt. ATP wurde durch ein ATP-Regenerationssystem bestehend aus 20 ng Pyruvat Kinase und 4 mM PEP bereitgestellt. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von ATP. Die Aktivität der Clp-Protease wurde durch die Abnahme der α -Casein-Konzentration bestimmt. Dazu wurden direkt nach dem Starten der Reaktion (T₀) sowie nach 2, 5, 7 und 10 Minuten Inkubation bei 37 °C Proben entnommen und mithilfe einer SDS-PAGE analysiert. Um zu zeigen, dass die Clp-Protease, bestehend aus Chaperon und proteolytischem Kern, für den Abbau von α -Casein notwendig ist, wurden in zwei Kontrollreaktionen die Protease ohne ClpC₆₈₀₃ (-ClpC) oder das Chaperon (-ClpP1-His/ClpR) mit α -Casein inkubiert. **B:** Schematischer Ausschnitt des Plasmids pACYC-Duet#ClpP1-His. Die Lage der für die Konstruktion eingesetzten Primer ist mit Pfeilen markiert und die im Rahmen der Klonierung verwendeten Restriktionsorte im Gen sind gekennzeichnet. **C:** α -Casein-Abbau durch ClpC₆₈₀₃-ClpP1-His. Der Versuch erfolgte wie unter A beschrieben, aber es wurde anstelle von ClpP1-His/ClpR nur ClpP1-His eingesetzt.

In Abbildung 2.16 A und C ist das Ergebnis der Versuche dargestellt. Man erkennt eine Abnahme der Intensität der α -Casein-Bande über die Zeit nach der Inkubation mit der putativen Clp-Protease ClpC₆₈₀₃-ClpP1-His/ClpR. Inkubierte man hingegen nur den proteolytischen Kern ClpP1-His/ClpR (-ClpC) oder ClpC₆₈₀₃ (-ClpP1-His/ClpR) mit α -Casein war keine Abnahme der Bandenintensität und damit kein Abbau des Proteins erkennbar. Bei der Inkubation von ClpP1-His, ClpC₆₈₀₃ und α -Casein, dargestellt in Abbildung 2.16 C, war ebenfalls keine Abnahme der α -Casein-Konzentration detektierbar.

Demnach bildet nur die Protease, bestehend aus ClpC₆₈₀₃, ClpP1 und ClpR, einen funktionellen, proteolytischen Komplex und ist in der Lage ein Substrat abzubauen. Die Protease ist demnach nur infolge eines Zusammenspiels aller Komponenten funktionell.

Die Reinigung und die Untersuchung zu der proteolytischen Aktivität der ClpC₆₈₀₃-ClpP3-His/ClpR-Protease erfolgten wie für ClpC₆₈₀₃-ClpP1-His/ClpR beschrieben. Es gelang jedoch nicht eine aktive Protease zu reinigen.

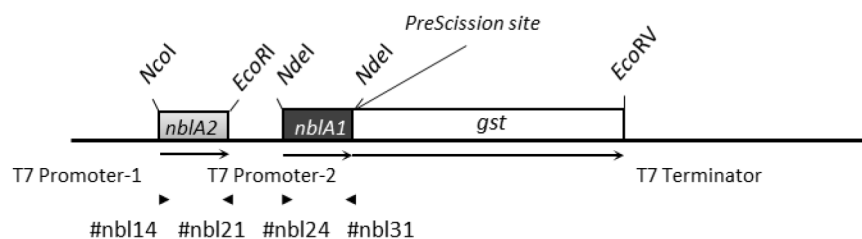
2.5.4 Abbau von NblA1 und NblA2

Nachdem die Aktivität der Clp-Protease nachgewiesen werden konnte, sollte in weiterführenden Versuchen untersucht werden, ob NblA1/NblA2 und die PBS durch ClpC₆₈₀₃-ClpP1-His/ClpR abgebaut werden.

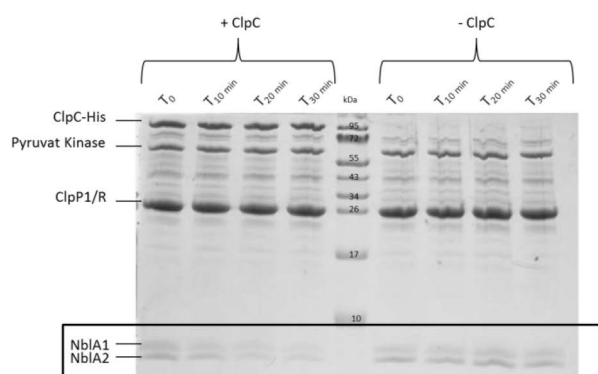
In einem ersten Versuch wurde geprüft, ob der Abbau von NblA1 und NblA2 durch die Clp-Protease möglich ist. Dafür wurde der in Abschnitt 2.5.3 beschriebene Versuch modifiziert, indem anstatt α -Casein heterolog koexprimiertes und gereinigtes NblA1 und NblA2 eingesetzt wurden.

Die Koexpression von NblA1/NblA2-GST in *E. coli* erfolgte analog zu der bereits beschriebenen Koexpression der ClpP1-His/ClpR-Protease vom pACYC-Duet Vektor (Abbildung 2.17 A) mit nur einen Affinitäts-Tag, der nach dem Verdau mit der PreScission®-Protease abgetrennt wurde, sodass man das NblA1/NblA2-Heterodimer ohne Affinitäts-Tag erhielt.

A



B



C

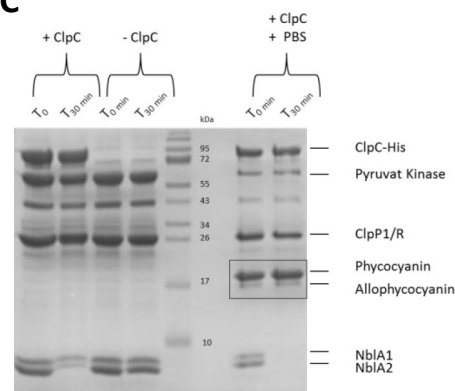


Abbildung 2.17: Untersuchung des NblA1/NblA2- und PBS-Abbaus durch eine rekombinante Clp-Protease.
A: Schematischer Ausschnitt des Plasmids pACYC-Duet#NblA1, NblA2-GST. Die Lage der für die Konstruktion eingesetzten Primer ist mit Pfeilen markiert und die im Rahmen der Klonierung verwendeten Restriktionsorte im Gen sind

gekennzeichnet. **B:** Abbau von NblA1/NblA2 durch die ClpC₆₈₀₃-ClpP1-His/ClpR-Protease. Für den Verdau von NblA1/NblA2 wurden äquimolare Mengen (2 µM) der gereinigten Proteine ClpC₆₈₀₃, ClpP1-His/ClpR und NblA1/NblA2 in Tris-Puffer C eingesetzt. Für eine ausreichende Menge ATP wurde ein ATP-Regenerationssystem bestehend aus 20 ng Pyruvat Kinase und 4 mM PEP, verwendet. Direkt nach dem starten der Reaktion durch ATP (T₀), sowie nach 10, 20, und 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden Proben entnommen und mithilfe einer SDS-PAGE analysiert. Um zu zeigen, dass ein spezifischer Abbau durch die Clp-Protease vorlag wurden in einer Kontrollreaktion alle Komponenten bis auf ClpC₆₈₀₃ eingesetzt. **C:** Untersuchung des PBS-Abbaus *in vitro*. Der Versuch erfolgte wie unter B beschrieben, zusätzlich zu den beschriebenen Komponenten wurden aus *Synechocystis* 6803-Zellextrakt gereinigte PBS in den Versuch eingesetzt.

Die Degradation des Heterodimers wurde durch die Abnahme der Proteinkonzentration von NblA1 und NblA2 verfolgt. Dafür wurden die entnommenen Proben mittels SDS-PAGE analysiert. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der Bandenintensität und damit der Proteinkonzentration von NblA1 und NblA2 in Anwesenheit der Protease (Abbildung 2.17 B). Inkubierte man NblA1 und NblA2 hingegen nur mit dem proteolytischen Kern, ohne ClpC₆₈₀₃, blieb die Proteinkonzentration des Heterodimers unverändert. Das zeigt, dass ClpC₆₈₀₃ das Heterodimer bestehend aus NblA1 und NblA2 erkennt, mit ihm interagiert und die Proteine, auch in Abwesenheit der PBS, entfaltet und in die proteolytische Kammer transportiert, wo sie degradiert werden.

Da die Clp-Protease bestehend aus ClpC₆₈₀₃ und ClpP1/ClpR NblA1 und NblA2 *in vitro* erkennt und abbaut, sollte in einem weiteren Versuch der Abbau der PBS durch den Proteasekomplex gezeigt werden. Dazu wurden neben NblA1 und NblA2 auch PBS als Substrat in den oben beschriebenen Abbauversuch eingesetzt. Um dabei möglichst nahe an nativen Bedingungen zu bleiben, wurden für den Versuch möglichst intakte PBS verwendet. Dafür wurden diese aus *Synechocystis* 6803 Zellextrakt in hochmolarem Salzpuffer, der das Auseinanderfallen der großen Komplexe verhindert, mithilfe eines Glycerindichtegradienten isoliert [92]. Die Disassemblierung der PBS während des Verdauversuches konnte jedoch nicht verhindert werden, da der Versuch, aufgrund des auf hohe Salzkonzentrationen empfindlich reagierenden Proteasekomplexes, nur bei niedrigen Salzkonzentrationen durchgeführt werden konnte.

Es zeigte sich, wie in Abbildung 2.17 C dargestellt, ein deutlicher Abbau des NblA-Heterodimers in An- oder Abwesenheit der PBS innerhalb von 30 Minuten. Erkennbar an der Abnahme der Intensität der NblA1- und NblA2-Banden, die im Kontrollversuch ohne ClpC₆₈₀₃ nicht erfolgt. Ein zusätzlicher Abbau von PC bzw. APC ist jedoch nicht zu erkennen. Ein möglicher Abbau von Linkerproteinen durch den Proteasekomplex ist nicht zu detektieren, da diese Banden in der SDS-PAGE aufgrund der geringeren Konzentrationen der Linkerproteine nicht zu erkennen sind.

Auch bei dem Einsetzen von PC-GST oder den löslichen Bestandteilen des *Synechocystis* 6803 Zellextrakts in den Versuch, die das Heterodimer NblA1/NblA2 nachweislich binden (2.4.4), konnte kein Abbau detektiert werden (nicht gezeigt).

2.5.5 Detektion des proteolytischen Abbaus durch Fluoreszenzabnahme

Ein von NblA1/NblA2 induzierter Abbau der PBS durch die Clp-Protease konnte demnach nicht nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass dabei methodische Gründe, wie z. B. eine zu geringe

Sensitivität der Methode, eine Rolle spielten, wurde in einem zweiten Versuchsaufbau die Degradation der untersuchten Proteine durch Abnahme der Fluoreszenz detektiert.

Zu diesem Zweck wurde in einem ersten Versuch der Abbau von NblA1 und NblA2 mittels Abnahme von GFP-Fluoreszenz untersucht. Dafür wurden beide *nblA*-Gene auf dem Duet-Vektor pCOLA koexprimiert, wobei NblA2 C-terminal mit GFP und NblA1 N-terminal mit einem His-Tag fusioniert waren (Abbildung 2.18 A). Die Reinigung des Heterodimers erfolgte mittels Affinitätschromatografie über den His-Tag des NblA1-Proteins. Abbildung 2.18 B macht deutlich, dass NblA2-GFP im Komplex mit His-NblA1 gereinigt wurde, sichtbar an der gelb-grünlichen Färbung des NblA2-GFP-Proteins unter Normallicht und dessen Fluoreszenz unter UV-Bestrahlung.

Das Experiment verlief ähnlich der unter Punkt 2.5.3 und Punkt 2.5.4 beschriebenen Versuche. 2 μ M gereinigtes His-NblA1/NblA2-GFP-Protein wurde mit äquimolaren Mengen His-ClpC₆₈₀₃ und ClpP1-His/ClpR bei 37 °C inkubiert. Eine ausreichende Menge ATP wurde durch ein ATP-Regenerationssystem zur Verfügung gestellt. Die Abnahme der Fluoreszenz wurde durch Anregung von GFP bei 385 nm in Emissionsspektren von 450-600 nm verfolgt. Dafür wurden direkt nach dem Start der Reaktion durch Zugabe von ATP sowie nach 30-minütiger Inkubation 5 μ l des Ansatzes entnommen, in 3 ml Tris-Puffer C verdünnt und im Fluoreszenzspektrometer vermessen. Um eine wärmebedingte Abnahme der Fluoreszenz durch Denaturierung von GFP auszuschließen, wurden in einer Negativkontrolle alle Proteine bis auf His-ClpC₆₈₀₃ inkubiert.

Das Ergebnis (Abbildung 2.18 C) zeigt die Abnahme des Fluoreszenzmaximums von GFP (509 nm) in Prozent. Dabei stellt der weiße Teil des Balkens die prozentuale Abnahme und der schwarze Teil die noch vorhandene Fluoreszenz in Prozent nach 30 Minuten dar. Aus dem Diagramm wird ersichtlich, dass es in An- und Abwesenheit von His-ClpC₆₈₀₃ zu einer Abnahme der Fluoreszenz kommt. Jedoch kann mit einem prozentualen Fluoreszenzverlust von 73,8 % in Anwesenheit von His-ClpC₆₈₀₃, gegen einen prozentualen Fluoreszenzverlust von 33,6 % durch Denaturierung von GFP, von einem spezifischen Abbau des Heterodimers ausgegangen werden. Der Versuch bestätigt die schon in Abbildung 2.17 B und C dargestellten Ergebnisse und zeigt außerdem, dass die Methode für die Detektion des PBS-Abbaus geeignet sein könnte.

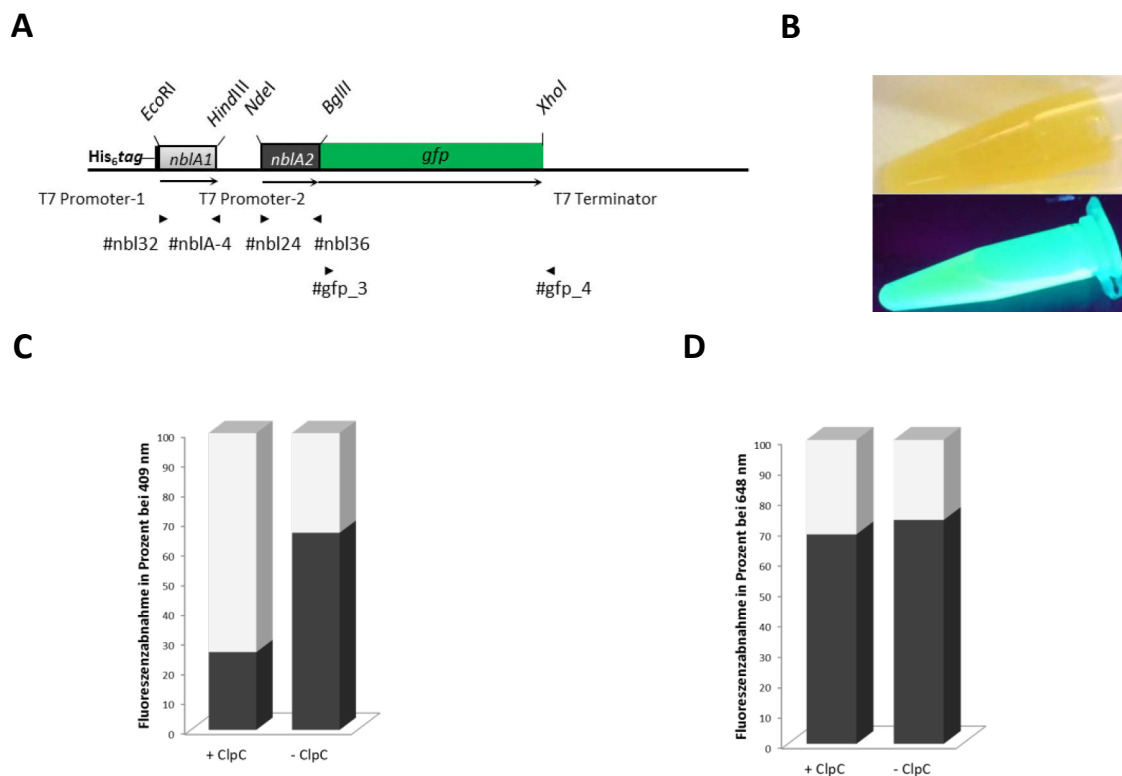


Abbildung 2.18: Analyse des NblA1/NblA2- und PBS-Abbaus mittels Fluoreszenzabnahme. **A:** Schematischer Ausschnitt des Plasmids pACYC-Duet#His-NblA1, NblA2-GFP. Die Lage der für die Konstruktion eingesetzten Primer ist mit Pfeilen markiert und die im Rahmen der Klonierung verwendeten Restriktionsorte im Gen sind gekennzeichnet. **B:** Gereinigtes His-NblA1, NblA2-GFP-Protein unter Normallicht (oben) und bei Bestrahlung mit UV-Licht (unten). **C:** Abbau von His-NblA1/NblA2-GFP durch die ClpC₆₈₀₃-ClpP1-His/ClpR-Protease. Dargestellt ist die prozentuale Abnahme der Fluoreszenz (grauer Balken) und die noch vorhandene Fluoreszenz nach 30 Minuten (schwarzer Teil des Balkens), die zusammen 100 % ergeben. Für den Verdau von NblA1/NblA2 wurden äquimolare Mengen der gereinigten Proteine ClpC, ClpP1-His/ClpR und His-NblA1/NblA2-GFP in Tris-Puffer C eingesetzt. Eine ausreichende Menge an ATP wurde durch ein ATP-Regenerationssystem bestehend aus 20 ng Pyruvat Kinase und 4 mM PEP zur Verfügung gestellt. Direkt nach dem Start der Reaktion durch ATP sowie nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden Proben entnommen und die GFP-Emission bei 509 nm detektiert. Dafür wurde GFP bei 385 nm angeregt und Emissionsspektren im Bereich von 450-600 nm aufgenommen. Um eine eventuell auftretende, wärmebedingte Abnahme der Fluoreszenz durch Denaturierung von GFP zu detektieren, wurden parallel in einer Negativkontrolle alle Proteine bis auf ClpC₆₈₀₃ inkubiert und zu den gleichen Zeitpunkten vermessen. **D:** Untersuchungen des PBS-Abbaus *in vitro*. Für die Untersuchungen der Degradation der PBS wurden äquimolare Mengen (2 µM) der gereinigten Proteine ClpC₆₈₀₃, ClpP1-His/ClpR und NblA1/NblA2 in Tris-Puffer C mit aus *Synechocystis* 6803-Extrakt gereinigten PBS inkubiert. Für eine ausreichende Menge ATP wurde ein ATP-Regenerationssystem bestehend aus 20 ng Pyruvat Kinase und 4 mM PEP, verwendet. Direkt nach dem Start der Reaktion durch ATP sowie nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden Proben entnommen. Die Excitation der PBS erfolgte bei 585 nm und die Emission wurde in einem Bereich von 600-700 nm verfolgt, wobei im Balkendiagramm nur das Maximum der Emissionsspektren dargestellt ist. Um eine eventuell auftretende, wärmebedingte Abnahme der Fluoreszenz durch die Disassemblierung der PBS zu detektieren, wurden parallel in einer Negativkontrolle alle Proteine bis auf ClpC₆₈₀₃ inkubiert und zu den gleichen Zeitpunkten vermessen.

Somit sollte eine Abnahme der PBS-Fluoreszenz durch deren Abbau ebenfalls zu detektieren sein. Um den Abbau zu messen wurde deshalb der schon unter 2.5.4 beschriebene Versuch zur Analyse des PBS-Abbaus wiederholt. Nur wurden diesmal die Proben nicht durch eine SDS-PAGE aufgetrennt, sondern die Fluoreszenz durch Anregung von PC bei 585 nm und Detektion der Emission zwischen 600 nm und 700 nm bestimmt. Um einen wärmebedingten Zerfall der PBS und somit einen unspezifischen Verlust der Fluoreszenz zu detektieren, wurden in einem Kontrollversuch alle Komponenten bis auf ClpC₆₈₀₃ inkubiert. Die Fluoreszenzabnahme in Prozent für das Maximum

(648 nm) der Emissionsspektren ist in Abbildung 2.18 D dargestellt. Dabei ist die prozentuale Abnahme der Fluoreszenz nach 30 Minuten in weiß und die prozentuale Fluoreszenz nach 30 Minuten in schwarz dargestellt. Vergleicht man die Ansätze mit und ohne ClpC₆₈₀₃, wird deutlich, dass es in beiden Proben zu einem ähnlichem Fluoreszenzverlust von etwa 30 Prozent kommt. Da ein spezifischer Abbau der PBS in Abwesenheit von ClpC₆₈₀₃ jedoch nicht möglich ist, kann man davon ausgehen, dass es sich bei dem Verlust der Fluoreszenz um den wärmebedingten Zerfall der PBS handelt und kein proteolytischer Abbau durch die Clp-Protease erfolgt. Der PBS-Abbau war demnach unter den gewährleisteten Versuchsbedingungen nicht möglich.

2.5.6 Werden NblA1 und NblA2 posttranslational reguliert?

Bei nicht diazotrophen Cyanobakterien wie *Synechocystis* 6803 kommt es unter Stickstoffmangel zu einer Vielzahl von Anpassungsprozessen. So werden neben dem vollständigen Abbau der PBS innerhalb der ersten 24 Stunden auch Kohlenstoffpolymere wie Glykogen, Cyanophycin und Poly- β -hydroxybutyrat als Speicherstoffe angelegt. Hält die Stickstofflimitation länger an, kommt es zu einem Abbau der Thylakoide, des Chlorophylls und einer Vielzahl von intrazellulären Proteinen. Die Zellen sind dadurch nahezu pigmentfrei und gehen in eine Art Ruhestadium über, in dem sie längere Stressperioden überdauern können. Die durch den Stickstoffmangel ausgelösten Prozesse werden dabei durch einen globalen Regulator (NtcA) kontrolliert (siehe Einleitung, Abschnitt 1.6). Zusätzlich scheinen die regulierten Gene der einzelnen Stoffwechselwege (Aufbau von Speicherprodukten, PBS-Abbau, Regulation der Lichtsammelkomplexe usw.) noch Querverbindungen (*crosstalk*) bei der Regulation aufzuweisen. So ist z. B. die Histidinkinase NblS, die für die Modulation von *nblA* notwendig ist, auch an der transkriptionellen Kontrolle von Genen beteiligt, die für die Antwort auf sich verändernde Lichtbedingungen verantwortlich sind. Auch konnte in unserer Arbeitsgruppe in Versuchen mit einer *Synechocystis* 6803-Mutante, die aufgrund der Deletion der Glykogen-Synthasegene kein Glykogen mehr bilden kann (Δ *glgA1/glgA2* *Synechocystis* 6803-Mutante), unter Stickstoffmangel ein verzögerter PBS-Abbau nachgewiesen werden [209], womit sich der letzte Abschnitt dieser Arbeit befasst.

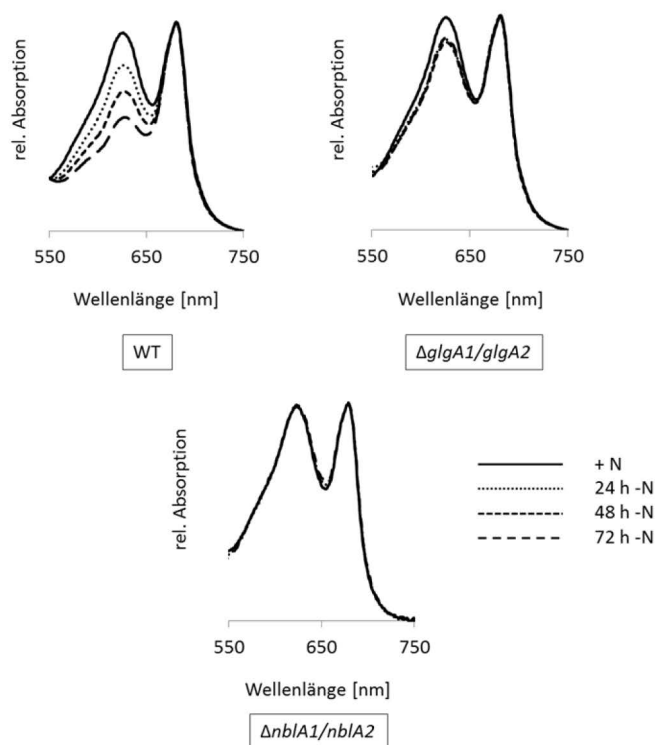
2.5.7 Untersuchungen des PBS-Abbaus in einer Glykogen-Synthase defizienten Mutante

Um die Glykogensynthese in *Synechocystis* 6803 zu inhibieren wurden die zwei für Glykogen-Synthasen kodierenden Bereiche (*slI0945* und *slI1393*) im Genom von *Synechocystis* 6803 durch eine Antibiotikaresistenzkassette ersetzt [209]. Die so erhaltene Δ *glgA1/glgA2* Deletionsmutante zeigte unter verschiedenen Bedingungen Wachstumseinschränkungen. So konnte ein leicht vermindertes Wachstum unter Tag/Nacht-Bedingungen gegenüber dem Wildtyp, sowie ein Unvermögen zu mixotrophen Wachstum durch eine stark verminderte Glukosetoleranz [209] festgestellt werden.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Unfähigkeit Glykogen zu bilden unter bestimmten Umständen (z. B. Stickstoffmangel) zu einem Überschuss an Produkten aus dem Kohlenstoffzyklus führte, was in einem Transport von Pyruvat ins Außenmedium resultiert [209] .

Neben den beschriebenen phänotypischen Veränderungen der Mutante konnte gezeigt werden, dass ein Abbau der PBS unter Stickstoffmangelbedingungen nur anfänglich möglich war [209] . Erkennbar war dies auch an den aufgenommenen Zellspektren, die in Anwesenheit von gebundenem Stickstoff sowie 24, 48 und 72 Stunden nach dessen Entzug aus dem Medium aufgenommen wurden (Abbildung 2.19 A).

A



B

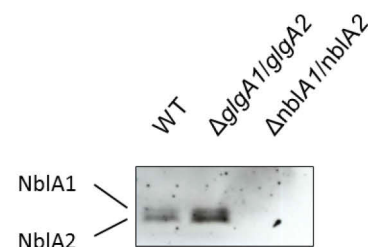


Abbildung 2.19: Verhalten der $\Delta glgA1/glgA2$ *Synechocystis* 6803-Mutante unter Stickstoffmangelbedingungen.

A: Absorptionsspektren ganzer Zellen bei Wachstum in Standardkulturmedium (+N) sowie 24, 48 und 72 Stunden nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium. Die Absorptionsspektren wurden auf die optische Dichte bei 750 nm und das Absorptionsmaximum des Chl *a* bei 680 nm normiert. **B:** Immunodetektion von NblA1 und NblA2. Die 24 Stunden nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium gesammelten Zellen des *Synechocystis* 6803-Wildtyp, sowie der $\Delta glgA1/glgA2$ und $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutanten wurden in Na/K-Phosphatpuffer (pH 7,6) aufgenommen und mittels Glasperlen aufgeschlossen. Die Immunodetektion der Proteine erfolgte im, pro Spur auf 2,5 μ g Chl *a* eingestellten, löslichen Teil des Zellextraktes. Die mittels einer SDS-PAGE separierten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und NblA1 und NblA2 mit einem Mix aus NblA1/NblA2-Antikörper detektiert.

Der durch Stickstoffmangel induzierte Abbau der PBS lässt sich in den Zellspektren anhand der abnehmenden PC-Absorption bei 620-630 nm verfolgen. Die Zellspektren des Wildtyps zeigen eine kontinuierliche Abnahme des PC-Peaks innerhalb der vermessenen 72 Stunden, wohingegen die PC-

Absorption in den Zellspektren der $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante nur innerhalb der ersten 24 Stunden leicht abnimmt und danach nahezu unverändert bleibt. Somit scheint der Abbau der PBS in den ersten 24 Stunden in kleinem Rahmen möglich, kommt danach jedoch zum Erliegen.

Vieles deutet darauf hin, dass ausschließlich die NblA-Konzentration den Abbau der PBS reguliert. So kann man auch in der $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante eine geringere NblA-Expression vermuten.

Um dies zu überprüfen, wurde die Konzentration der NblA-Proteine unter Stickstoffmangelbedingungen mittels eines Immunoblots untersucht. Dafür wurden Zellen des Wildtyps und der Mutanten $\Delta glgA1/glgA2$ und $\Delta nblA1/nblA2$ (als Negativkontrolle) 24 Stunden nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium geerntet, aufgeschlossen und die Proteine der, auf 2,5 μ g Chl *a* eingestellten, löslichen Zellextrakte mittels SDS-PAGE separiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion von NblA1 und NblA2 erfolgte mithilfe eines Mix aus NblA1/NblA2-Antikörpern.

Abbildung 2.19 B zeigt den Immunoblot. Deutlich zu erkennen ist ein NblA1- und NblA2-Signal im Wildtyp und der $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante, wohingegen in der $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante, wie zu erwarten, kein NblA1- bzw. NblA2-Protein detektiert werden kann. Das Ergebnis überrascht, denn in der $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante, die nachweislich nach 24 Stunden keinen PBS-Abbau mehr zeigt, ist eine höhere NblA1/NblA2-Konzentration als im Wildtyp zu beobachten. Im Wildtyp würde dies zu einem schnelleren Abbau der PBS führen und nicht zu einem Stopp des Abbauprozesses. Die Annahme, dass der PBS-Abbau in der $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante im Zusammenhang mit einer geringen NblA-Konzentration steht, ist somit nicht zutreffend. Die Regulation des Abbauprozesses muss demnach auf anderem Wege erfolgen.

2.5.8 Untersuchung der Heterodimerisierung von NblA1 und NblA2

In einem weiteren Versuch sollte untersucht werden, ob durch die hohe Konzentration an Kohlenstoffassimilaten die Interaktion von NblA1 mit NblA2 gestört ist. Dazu wurde die Heterodimerbildung *in vivo* mittels spektroskopischer FRET-Messungen unter Stickstoffmangelbedingungen, wie unter 2.4.3.2 beschrieben, untersucht.

Die Expression der NblA-Fluorophor-Fusionsproteine (Konstrukt ist in Abbildung 2.7 dargestellt) erfolgte unter dem eigenen Promotor *in trans* auf dem sich selbst replizierenden Vektor pVZ321-Spec in der *Synechocystis* 6803 $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante. Die Expression der NblA-Proteine wurde durch den Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium induziert und der Abbau der PBS innerhalb der ersten 48 Stunden anhand von Zell- und Fluoreszenzspektren verfolgt.

Abbildung 2.20 A zeigt die Absorptionsspektren ganzer Zellen in Standardkulturmedium bzw. 24 und 48 Stunden nach Stickstoffentzug in der $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante, der NblA1_YFP, NblA2_Cer $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante und der NblA1_YFP, NblA2_Cer $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante. Die

Absorptionsspektren zeigen bei allen drei Mutanten einen Abbau der PBS. Bei der $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante ist dieser allerdings nur in geringen Maße innerhalb der ersten 24 Stunden zu beobachten. Durch die Expression der NblA-Fluorophor-Fusionsproteine in der $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante kommt es innerhalb der ersten 24 Stunden zu einem vermehrten Abbau der PBS, der danach nur noch in geringem Maße zu verzeichnen ist. Hingegen kommt es in der $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante, wie bekannt, zu einem gleichmäßigen PBS-Abbau über die gesamten 48 Stunden.

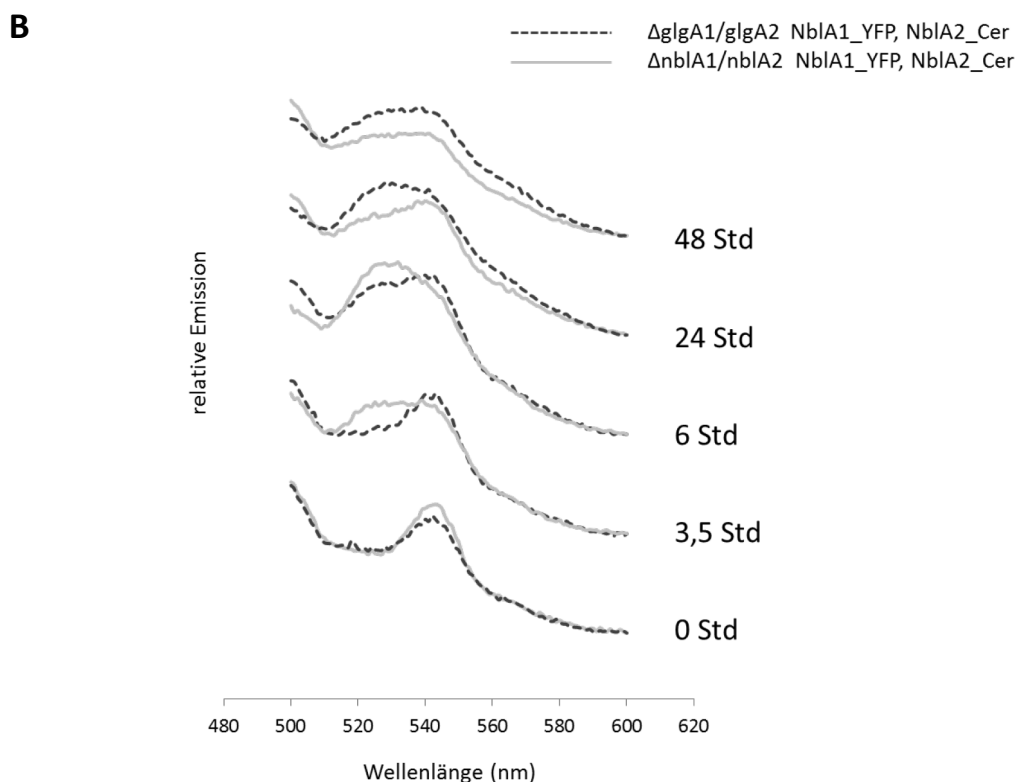
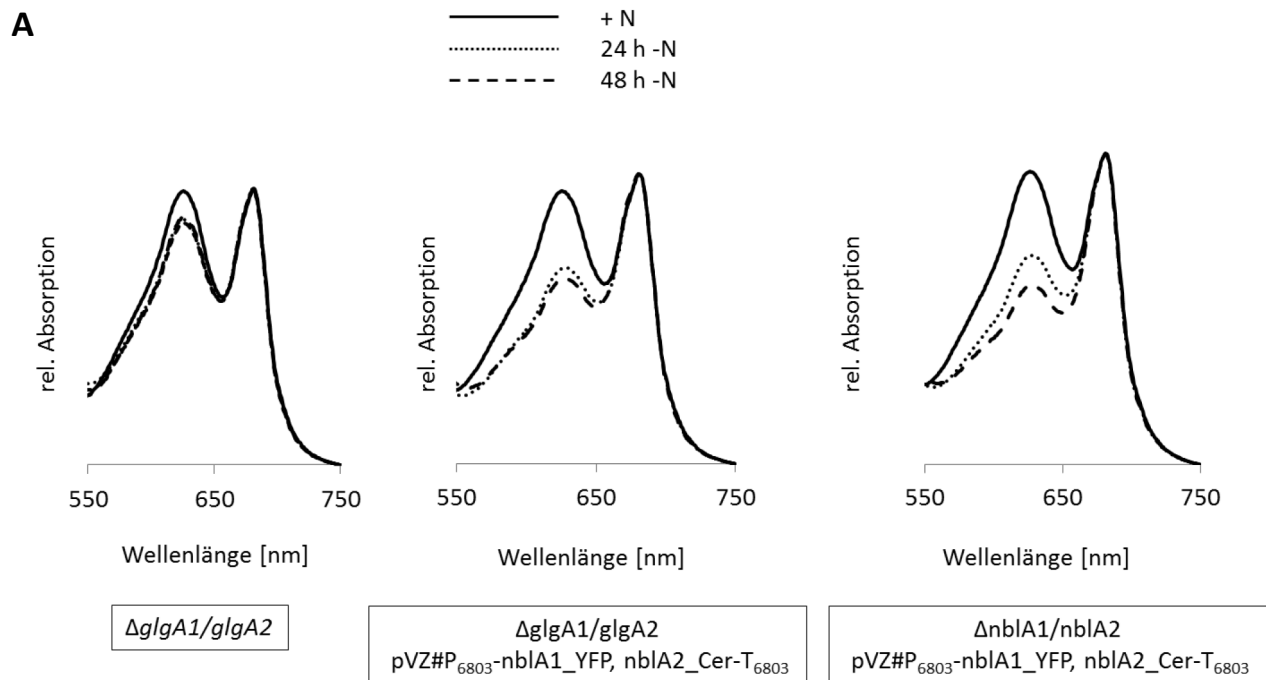


Abbildung 2.20: Untersuchung der Dimerisierung von NblA1 mit NblA2 in der $\Delta glgA1/glgA2$ *Synechocystis* 6803-Mutante unter Stickstoffmangelbedingungen. **A:** Absorptionsspektren ganzer Zellen bei Wachstum in Standardkulturmedium (+N) sowie 24 und 48 Stunden nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium. Die Absorptionsspektren wurden auf die optische Dichte bei 750 nm und das Absorptionsmaximum des Chl *a* bei 680 nm normiert. **B:** Emissionsspektren ganzer Zellen. Die Expression der NblA-Fluorophor-Fusionsproteine erfolgte durch den Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium. Die Proben wurden direkt nach dem Entzug (0) sowie 3, 5, 6 und 24 Stunden später entnommen. Für die Aufnahme der Emissionsspektren ganzer Zellen wurden 3 ml Zellkultur (OD_{750} von 0,3) verwendet, die Anregung von Cer erfolgte bei einer Wellenlänge von 458 nm und die Emission von YFP wurde in einem Bereich von 500-600 nm detektiert.

Die Fluoreszenzspektren sind in Abbildung 2.20 B dargestellt. In beiden Mutanten kann direkt nach dem Umsetzen in stickstofffreies Medium (0 Std) ein Emissionspeak im Bereich von 535-550 nm beobachtet werden, der wie schon unter Punkt 2.4.3.2 beschrieben, auf der natürlichen Eigenfluoreszenz der *Synechocystis* 6803-Zellen beruht. Ein FRET-Signal durch Energieübertragung vom Donor Cer auf den Akzeptor YFP ist in beiden untersuchten Mutanten nach dreieinhalbständiger Stickstoffdepletion zu beobachten. Die Akzeptoremission erreicht bei der $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante nach 6 Stunden ihren Höchststand und fällt dann bis zum 48 Stundenwert wieder ab. Betrachtet man die YFP-Emission bei der Expression von NblA1_YFP, NblA2_Cer in der $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante, erkennt man ebenfalls eine Zunahme der Akzeptorfluoreszenz von YFP innerhalb der ersten 6 Stunden. Diese fällt jedoch geringer aus als bei der Expression von NblA1_YFP, NblA2_Cer in der $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante. Der Höchststand der Akzeptoremission wird hier erst nach 24 Stunden erreicht. Der langsamere Anstieg der Emission von YFP ist auf das Vorhandensein von zusätzlichem NblA1 und NblA2 zurückzuführen, was durch die zusätzliche Expression der chromosomalen *nblA*-Gene in der $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante zu klären ist. Die Expression dieser NblA-Proteine kann zu einer Interaktion zwischen „freiem“ NblA1/NblA2 mit NblA2/NblA1-Fluorophor-Fusionsproteinen führen, was jedoch nicht in den Emissionsspektren dokumentiert werden kann.

Die Ergebnisse der Emissionsspektren zeigen bei der Expression von NblA1_YFP, NblA2_Cer eine Dimerisierung der Proteine in beiden untersuchten Mutanten. Jedoch kommt es in der $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante zu einer erhöhten YFP-Emission nach 24 Stunden im Vergleich zur $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante und auch nach 48 Stunden ist noch ein deutlich höheres FRET-Signal zu detektieren.

Es zeigte sich, dass eine Expression von NblA1 und NblA2 in der $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante zu einem, im Vergleich zur $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante, verstärktem PBS-Abbau führt, der aber nach 24 Stunden nur noch in sehr geringem Maße erfolgt. Dies spiegelt sich auch in einer erhöhten NblA1/NblA2-Konzentration wieder, erkennbar an dem YFP-Emissionssignal. Demnach scheint NblA1/NblA2 zu akkumulieren.

3. Diskussion

3.1 PBS-Abbau in Cyanobakterien, ein ubiquitärer Mechanismus?

Die Akklimatisation an Stickstoffmangel erfolgt in Cyanobakterien auf unterschiedlichste Weise, so bauen diazotrophe Cyanobakterien wie *Nostoc* 7120 bei der Anpassung an Stickstoffmangel nur einen Teil ihrer PBS ab, während nicht diazotrophe Cyanobakterien wie *Synechocystis* 6803 ihre gesamten Lichtsammelkomplexe degradieren und in ein Dauerstadium übergehen. Trotz dieser unterschiedlichen Adaptionsmechanismen besitzen, soweit bekannt, fast alle Cyanobakterien Homologe des NblA-Proteins, dessen Expression in den untersuchten Cyanobakterien für den PBS-Abbau essentiell ist [175, 188, 189, 194]. Dabei ist allerdings nicht geklärt, ob der NblA-induzierte Abbau der PBS in allen Cyanobakterien nach dem gleichen Prinzip verläuft. Vergleicht man die Sequenzen von NblA-Proteinen [192, 193], ist nur eine geringe Sequenzähnlichkeit erkennbar, allerdings zeigen kristallisierte NblA-Homologe eine hohe Strukturähnlichkeit [192, 193]. Zusätzlich weisen NblA-Proteine mit der ClpC-Bindestelle in der N-terminalen Helix [187] und der PBS-Bindestelle in der C-terminalen Helix [192] zwei konservierte Bereiche auf, die für einen ubiquitären Abbaumechanismus der PBS sprechen. Ein Indiz für solch einen Mechanismus ist z. B. die Komplementation des nicht bleichenden Phänotyps der $\Delta nblA$ *Synechococcus* 7942-Mutante durch Dines *et al.* [193] und der *Synechocystis* 6803 $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante in dieser Arbeit (Abbildung 2.3) durch die Expression von NblA₇₁₂₀. Diese Ergebnisse werden durch die *in vitro*-pulldown-Versuche, die eine Interaktion von NblA₇₁₂₀ mit drei ClpC-Orthologen aus *Nostoc* 7120, *Synechocystis* 6803 und *Synechococcus* 7942 zeigten, bestätigt. NblA₇₁₂₀ kann demnach nicht nur das NblA-Protein aus *Synechococcus* 7942 ersetzen, sondern übernimmt auch die Rolle beider NblA-Proteine aus *Synechocystis* 6803 (Abbildung 2.2).

3.2 NblA1 und NblA2 - ein Heterodimer

Bis zu Beginn dieser Arbeit war wenig über die Struktur und Funktion von NblA1 und NblA2 aus *Synechocystis* 6803 bekannt. Gezeigt wurde schon im Vorfeld, dass beide Proteine für den PBS-Abbau essenziell sind [189], jedoch mit 32 % nur eine geringe Identität zueinander aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Koexpression und -reinigung von NblA1 und NblA2 *in vitro* das Heterodimer als biologisch aktive Form identifiziert werden. Dieses Ergebnis wurde durch *in vivo*-Interaktionsanalysen mittels FRET bestätigt.

Protein-Protein-Interaktionen mithilfe von FRET nachzuweisen erfreut sich in den letzten Jahren immer größerer Beliebtheit. Die Methode ist aufgrund der großen Anzahl an fluoreszierenden Molekülen in Cyanobakterien jedoch nicht weit verbreitet. Eine spannende Variante der FRET-Interaktionsanalyse in Cyanobakterien ist die Ausnutzung der natürlichen Fluoreszenz für die

Interaktionsanalyse. Van Thor und Kollegen konnten so die Interaktion der NADP⁺-Reduktase mit Teilen der PBS in *Synechocystis* 6803 nachweisen [210, 211]. Dafür wurde die N-Domäne der NADP⁺-Reduktase mit GFP fusioniert und die Energieübertragung von GFP auf Teile der PBS (APC und PC) untersucht. Auch *in vitro* werden die photoaktiven Bestandteile der PBS häufig als FRET-Donor und/oder -Akzeptor verwendet [212, 213, 214]. Diese Eigenfluoreszenz der Cyanobakterien stellt bei Untersuchungen mit Varianten des GFP als FRET-Paar, wie z. B. CFP und YFP ein Problem dar. Trotzdem konnten Ji und Kollegen 2007 eine Methode für *in vivo*-FRET-Messungen mit CFP und YFP in *Synechocystis* 6803 beschreiben [215]. Hierbei wurde die NDH mit CFP oder YFP gelabelt und das auftretende FRET-Signal mithilfe eines konfokalen Laserscanmikroskops abgebildet (FRET *imaging*) sowie die Lebenszeit von CFP bestimmt (FLIM-FRET). Bei dem Versuch, die durch Ji und Kollegen etablierte Methode auch auf die Interaktionsanalyse von NblA1 und NblA2 zu übertragen, musste festgestellt werden, dass die Detektion eines FRET-Signals durch FLIM-FRET-Messungen mit CFP und YFP als FRET-Paar aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz der *Synechocystis* 6803-Zellen nicht möglich war. Auch bei dem Versuch die Lebenszeit von CFP spektroskopisch zu ermitteln, konnte kein Emissionssignal detektiert werden. Erst bei der Verwendung des 2,5-mal heller fluoreszierenden Ceruleans [203] war eine Bestimmung der Lebenszeit in einem zeitaufgelösten Spektralfluorimeter möglich.

Neben der Bestimmung der von Konzentration und Rauschen unabhängigen Lebenszeit, wurde in dieser Arbeit das durch die NblA1-NblA2-Interaktion entstehende FRET-Signal durch Aufnahme von Fluoreszenzspektren detektiert. Diese wenig aufwendige Methode eignet sich gut dafür das Akzeptor-Emissionssignal im Zeitverlauf darzustellen. Jedoch ist zu beachten, dass die direkte Anregung und Detektion der Cer- bzw. YFP-Emission in Cyanobakterien aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz nicht möglich ist (Abbildung 2.9 A), sodass die Bestimmung der gebräuchlicher Weise angegebenen FRET-Effizienz nicht möglich war. Um also einzuschätzen, ob das FRET-Signal in Korrelation zu der Proteinkonzentration steht, ist die Detektion der Fluoreszenzproteine auf einem anderen Weg, wie z.B. durch einen Immunoblot, oder durch Lebenszeitmessungen notwendig.

In Kombination sind die in dieser Arbeit etablierten Methoden gut dazu geeignet *in vivo*-FRET-Messungen in Cyanobakterien durchzuführen. Als zusätzliche Optimierung könnte neben dem helleren FRET-Donor auch ein hellerer FRET-Akzeptor verwendet werden. Ein möglicher Kandidat ist Venus, eine heller strahlende Variante des YFP, die schon bei *in vitro*-Untersuchungen zur circadianen Uhr aus *Synechococcus* 7942 zusammen mit Cer eingesetzt wurde [216]. Eine weitere, denkbare Alternative ist die BiFC (*Bimolecular Fluorescence complementation*)-Methode. Hierbei wird das Fluoreszenzprotein in zwei Fragmente aufgeteilt. Werden die Fragmente in räumliche Nähe zueinander gebracht, lagern sie sich zu einem Protein zusammen und bilden ein funktionelles Fluorophor. Diese Interaktion ist jedoch irreversibel, sodass dynamische Interaktionen nicht erfasst

werden können [217]. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Fluoreszenz nur auftritt, wenn eine Interaktion und dadurch eine Zusammenlagerung der Teile des Fluoreszenzproteins erfolgt. Ein mögliches Protein für Interaktionsanalysen in Cyanobakterien wäre dabei GFP (Split-GFP), da die GFP-Fluoreszenz in Cyanobakterien, wie für NblA₇₁₂₀-GFP gezeigt (Abbildung 2.1), problemlos mikroskopisch nachgewiesen werden kann.

3.3 Das Heterodimer aus NblA1/NblA2 interagiert mit PBP und ClpC

Nachdem das Heterodimer als biologisch aktive Form von NblA1 und NblA2 identifiziert werden konnte, konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf potentielle Interaktionspartner desselben. Da die Expression von NblA₇₁₂₀ in der *Synechocystis* 6803 *nblA1/nblA2*-Mutante den Wildtyp-Phänotyp wieder herstellen konnte (Abschnitt 2.3.1), war eine dem NblA₇₁₂₀ ähnliche Funktion wahrscheinlich. Durch *in vitro-pulldown*-Untersuchungen konnte die Interaktion mit ClpC und den PBP bestätigt werden (Abschnitt 2.4.4). Weitere *in vitro-pulldown*-Versuche zeigten überraschenderweise, dass NblA1 beide Interaktionspartner bindet, während NblA2 mit keinem interagiert (Abbildung 2.13).

Der wahrscheinlichste Grund für die nicht nachweisbare Protein-Protein-Interaktion von NblA2 mit ClpC scheint eine fehlerhafte heterologe Expression von NblA2 in *E. coli*. Vergleicht man die CD-Spektren (Abbildung 2.4) der NblA-Proteine, erkennt man, dass die errechnete Sekundärstruktur von NblA2 deutlich von der der anderen beiden NblA-Proteine abweicht. NblA2 besitzt zwar, wie NblA₇₁₂₀ und NblA1, große α -helikale Bereiche, zusätzlich aber auch einen hohen Anteil an ungeordneten Bereichen und β -Faltblattstrukturen. Diese Struktur könnte von der nativen NblA2-Struktur abweichen und so eine Interaktion mit anderen Proteinen verhindern. Obendrein zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien, dass die Abwesenheit von NblA1 bei der Expression von NblA2 die Ausbildung eines NblA2-Homodimers fördert. Die fehlende Funktionalität könnte also auch eine Folge der Ausbildung eines NblA2-Homodimers sein, das nicht dem biologisch aktivem Zustand entspricht. Dies oder die Abwesenheit von NblA1 könnten für eine falsche Faltung des Proteins verantwortlich sein.

Die Komplementationsanalysen mit den NblA-Fluorophor-Fusionsproteinen zeigen, dass nur das Verdecken beider N-Termini zu einem Funktionsverlust des Heterodimers führt. Wurde dagegen nur ein N-Terminus des NblA-Heterodimers mit einem Fluorophor fusioniert, war das Dimer funktionell. Dabei war es unerheblich, ob NblA1 oder NblA2 das Fluorophor am N-Terminus trugen, was vermuten lässt, dass beide NblA-Proteine ClpC binden und was somit den Verdacht erhärtet, dass das rekombinante NblA2-Protein nicht funktionell war.

Eine geringe Wahrscheinlichkeit besteht allerdings darin, dass ClpC nur mit NblA1 interagiert. Erklärbar wäre dies, wenn eine sterische Hinderung der ClpC-NblA1-Interaktion nur erfolgt, wenn

beide N-Termini mit einem Fluorophor fusioniert sind. Diese Möglichkeit lässt den Gedankengang zu, dass das Ergebnis der hier dargestellten *in vitro*-Analysen kein Artefakt darstellt und NblA2 auch *in vivo* nicht mit den PBS und ClpC interagiert. Bei einem solchen Szenario sind zwei Funktionsweisen für NblA2 denkbar. Zum einen könnte es die Stabilität und korrekte Faltung von NblA1 gewährleisten, oder aber mit einem weiteren, noch unbekannten Protein interagieren. Als möglicher Interaktionspartner für NblA2 wäre eine Billin-Lyase denkbar. Billin-Lyasen katalysieren die Bindung des Chromophors an spezifische Cysteinreste des Apoproteins der PBS-Untereinheit [218]. Auch bei der Abspaltung des Chromophors vom PBS wird Lyaseaktivität vermutet. Für *Synechococcus* 7942 wurde von Dolganov und Grossman [179] mit *nblB* ein Gen identifiziert, dessen Ausschalten zu einem nicht bleichenden Phänotyp führte. NblB ist ein Homolog der Lyase CpcE [218], welche in *Synechococcus* PCC 7002 einen Teil der heterodimeren Lyase CpcE/F darstellt. Diese katalysiert die korrekte Bindung und das Lösen von Phycocyanobilin an spezifische Cysteinreste [219, 220]. Für NblB ist hingegen keine Chromophoranheftungsaktivität bekannt, sodass angenommen wird, dass es beim Abbau der PBS eine Rolle spielt. In *Synechocystis* 6803 sind mit *nblB1* (*sll1663*) und *nblB2* (*sll1687*) zwei *nblB*-ähnliche Gene bekannt [175]. Die Analyse von Deletionsmutanten der NblB-Orthologe aus *Synechocystis* 6803 zeigte jedoch, dass nur die $\Delta nblB1$ -Mutante einen leicht verzögerten PBS-Abbau zeigte, während sich die $\Delta nblB2$ -Mutante wie der Wildtyp verhielt [175]. Die identifizierten NblB-Varianten scheinen in *Synechocystis* 6803 demnach keine essentielle Rolle beim Abbau der PBS zu spielen. Möglicherweise ist das Lösen des Chromophors für den Abbau der PBS nicht zwingend erforderlich, oder es ist noch eine weitere Lyase in den Abbauprozess verwickelt. Durch S. Nicklisch und W. Lockau konnte gezeigt werden, dass bei dem Abbau der PBS Chromopeptide ins Außenmedium abgegeben werden (unveröffentlichte Daten, mündliche Mitteilung S. Nicklisch). Durch die Analyse dieser Chromopeptide mittels MALDI/MS und NMR soll nun die Zusammensetzung der ins Außenmedium gegebenen Chromophore mit eventuellem Proteinanteil untersucht und so möglicherweise eine am PBS-Abbau beteiligte Lyase identifiziert werden.

3.4 Regulation von NblA

Da die Expression von NblA ausreicht um einen Abbau der PBS zu induzieren [188], ist seine Transkription streng reguliert. In *Synechococcus* 7942 konnten fünf *nblA*-Promotoren ($P_{nblA(1-5)}$) identifiziert werden [221], die eine feine Regulation der *nblA*-Expression unter verschiedenen Bedingungen vermuten lassen. Der Promotorbereich beinhaltet dabei drei NtcA-Bindestellen, sowie ein HLR1-Element (*multiple high-light regulatory sequence*), welches sich meist in Promotorbereichen von NblS-kontrollierten Genen befindet [184]. Über das HLR1-Element wird eine NblS-abhängige Repression vermutet [184, 185]. Auch für den Response Regulator RpaB konnte eine Interaktion mit

HLR1 gezeigt werden. Hanaoka *et al.* [222] vermuten deswegen unter normalen Lichtbedingungen eine Repression von *nblA* durch RpaB, die unter Starklicht aufgehoben werden könnte. Die Aktivierung der *nblA*-Transkription erfolgt vermutlich durch NtcA und NblR [221, 223]. Bis zu Beginn dieser Arbeit war jedoch nicht bekannt, ob die NblA-Proteinmenge reguliert wird. Der wahrscheinlichste Mechanismus wäre dabei der Abbau von NblA gemeinsam mit seinem Substrat durch eine Clp-Protease, da diese Art der Regulation schon für eine Vielzahl von Adapterproteinen gezeigt werden konnte. Ein bekanntes Beispiel ist das gut untersuchte Adapterprotein MecA aus *Bacillus subtilis*, welches für die Hexamerisierung des Chaperons ClpC essentiell ist. MecA bindet zunächst an ClpC und interagiert dann mit einem Substrat, wie dem Transkriptionsfaktor ComK oder ComS. Zusammen mit diesem erfolgt der Abbau von MecA durch die Clp-Protease ClpC-ClpP [208, 224, 225, 226]. Jedoch werden nicht alle Adapterproteine zusammen mit ihrem Substrat abgebaut. Diese, auch als Modulatoren bezeichneten Proteine, binden an die Clp-Protease und verändern deren Substratspezifität ohne selbst abgebaut zu werden. So interagiert z. B. ClpS aus *E. coli* mit dem N-Terminus von ClpA und erschwert dadurch den Abbau von *ssrA*-markierten Substraten während es gleichzeitig die Affinität von ClpA-ClpP für aggregierte Substrate [227] sowie N-End-Regel-Substrate [81] erhöht.

Durch Mutation der ClpC-Bindestelle im NblA-Protein sowie einer GFP-Fusion konnte im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* und *in vivo* eine Akkumulation des NblA₇₁₂₀(L7A)-GFP-Proteins unter Stickstoffmangelbedingungen beobachtet werden (Abbildung 2.1). Eine Strukturveränderung von NblA₇₁₂₀(L7A) durch die Mutation von Leucin₇ zu Alanin konnte dabei aufgrund der gleichen Eigenschaften im CD-Spektrum und der Dimerisierung des Proteins ausgeschlossen werden. Der Funktionsverlust des Proteins und seine Akkumulation in den Zellen ist also auf eine fehlende Interaktion von NblA₇₁₂₀ mit ClpC zurückzuführen. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch für *Synechocystis* 6803 beobachtet werden. Hier wurde bei den im Vorfeld der FRET-Messungen untersuchten NblA-Fluorophor-Fusionsproteinen mit N-terminalem Fluorophor (YFP_NblA1, Cer_NblA2) ein nicht bleichender Phänotyp festgestellt (Abbildung 2.8 B). Auch konnte ClpC, vermutlich aufgrund einer sterischen Hinderung, nicht an NblA1/NblA2 binden und die Immunodetektion der NblA-Fluorophor-Fusionsproteine ergab ebenfalls eine Akkumulation der Proteine (nicht gezeigt).

NblA wird demnach, wie schon für eine Vielzahl von anderen Adapterproteinen gezeigt, gemeinsam mit seinem Substrat durch ClpC entfaltet und durch eine mit ClpC interagierende Clp-Protease abgebaut.

3.5 Identifizierung der am PBS-Abbau beteiligten Clp-Protease

Gegenstand weiterer Untersuchungen war es den PBS-Abbau im Detail zu analysieren. Dafür musste zunächst die beteiligte Clp-Protease identifiziert sowie diese dann als funktioneller Komplex heterolog exprimiert und gereinigt werden. Da NblA mit ClpC interagiert, stand ClpC als Chaperonpartner der Protease fest, wohingegen zu den proteolytischen Kernkomplexen in *Synechocystis* 6803 noch keine Untersuchungen vorlagen. Aus *Synechococcus* 7942 weiß man, dass sich der heptamere Kern aus zwei separaten Clp-Untereinheiten zusammensetzt. Insgesamt wurden vier verschiedene proteolytische Untereinheiten identifiziert, von denen bekannt ist, dass sie drei verschiedene Kombinationen bilden können [33]. Diese übernehmen im Zusammenspiel mit ihrem jeweiligen Chaperon verschiedene Aufgaben in der Zelle. So ist der konstitutiv exprimierte ClpP3/ClpR-Kern essenziell für die Homöostase der Zelle [34, 228], wogegen der Kernkomplex bestehend aus ClpP1/ClpP2 für das normale Wachstum nicht entscheidend ist, sondern unter verschiedenen Stressbedingungen wie Starklicht und Kälte induziert wird [35, 228]. Die Existenz eines dritten Kernkomplexes, bestehend aus ClpP1 und ClpR, der membrangebunden vorliegt, wurde hingegen nur vermutet. Unveröffentlichte Quervernetzungsexperimente von Stanne *et al.* [33] lassen jedoch eine Interaktion der membranständigen Protease mit den PBS vermuten, was den PBS-Abbau durch diese impliziert. Bei dem Umsetzen von $\Delta clpP1$ *Synechococcus* 7942-Mutanten in stickstofffreies Medium konnte jedoch kein verzögerter Abbau der PBS beobachtet werden [174]. Generell zeigte sich bei der Deletion von *clpP1* eine verstärkte Expression von ClpP3 [174]. Lokalisationsanalysen von ClpP3 in der *clpP1*-Deletionsmutante identifizierten dann einen Teil des, unter normalen Bedingungen im löslichen Extrakt lokalisierten, ClpP3-Proteins in der Membranfraktion. Stanne *et al.* [33] vermuteten deswegen, dass ClpP3 beim Fehlen von ClpP1 zusammen mit ClpR und ClpC eine membranständige Protease ausbilden kann. In *Synechocystis* 6803 konnten durch eine BLAST-Analyse (Abbildung 2.14) Orthologe aller vier, für *Synechococcus* 7942 bekannten, proteolytischen Untereinheiten identifiziert werden. Jedoch zeigten Transkriptomanalysen für die *clp*-Gene und *clpC* in *Synechocystis* 6803 vier Stunden nach Umsetzen in stickstofffreies Medium keine nennenswert verstärkte Expression [229]. Demnach erfolgt als Antwort auf Stickstoffstress nur die verstärkte Expression des Adapterproteins NblA. Für die *in vitro*-Versuche sollten aufgrund der scheinbaren Austauschbarkeit der proteolytischen Untereinheiten beide mit ClpC interagierenden Proteasen untersucht werden.

Nach der heterologen Expression und Reinigung der Proteasen wurde die proteolytische Aktivität der Proteinkomplexe überprüft. Dabei konnte für die in *Synechococcus* 7942 gut untersuchte ClpC-ClpP3/ClpR-Protease in *Synechocystis* 6803 keine Aktivität festgestellt werden. Es soll auch nicht unerwähnt bleiben, dass die Reinigung einer proteolytisch aktiven Clp-Protease generell kein triviales Unterfangen war. ClpC-ClpP1/ClpR reagierte sehr sensitiv auf die Salzbedingungen im

Reinigungspuffer, z. B. führte die Zugabe von NaCl anstatt KCl zur Inaktivierung der Protease, des Weiteren war die Lage des Affinitäts-Tags für die Aktivität von entscheidender Bedeutung.

Letztendlich konnte für die ClpC-ClpP1-His/ClpR-Protease eine proteolytische Aktivität durch den Abbau von α -Casein nachgewiesen werden (Abbildung 2.16). Die Aktivität war dabei mit der der ClpC-ClpP3/ClpR-Protease aus *Synechococcus* 7942 vergleichbar [206]. Beide Proteasen bauten jedoch im Vergleich zu der Modelprotease ClpA-ClpP aus *E. coli* deutlich langsamer α -Casein ab [206, 230]. Anderson *et al.* (2009) diskutierten als möglichen Grund für die geringere Aktivität eine verringerte Translokationsrate in die proteolytische Kammer. Diese scheint bedingt durch unstrukturierte Bereiche von ClpR rund um die Eintrittspore, die aus der Fassstruktur der Protease ragen [206]. Diese „Pin“ genannten Regionen von ClpR sind entscheidend für die Interaktion mit ClpC [206, 231]. Als weiteren Grund diskutieren Andersson *et al.*, dass um die Eintrittspore in die proteolytische Kammer laut dem ClpP3/ClpR-Modell mehr hydrophobe Reste angeordnet sind als der ClpP-Kern aufweist, was die Effektivität der Translokation in die proteolytische Kammer beeinflussen könnte. Aufgrund der ähnlichen Reaktionszeit beim Abbau von α -Casein kann eine dem ClpP3/ClpR entsprechende Struktur für ClpP1/ClpR angenommen werden. Auch die Interaktion mit dem gleichen Chaperonpartner spricht für eine ähnliche Struktur der proteolytischen Kernkomplexe. Neben dieser „Pin“-Region im ClpR konnten erst kürzlich im ClpC- und ClpP3-Protein aus *Synechococcus* 7942 Motive identifiziert werden, die für die Interaktion des Komplexes entscheidend sind. ClpC besitzt demnach neben dem in HSP100-Chaperon konservierten P-Loop (IGL/L[I]GF) das ebenfalls C-terminal liegende R-Motiv, dass für die Interaktion mit ClpP3/ClpR entscheidend ist [231], auch ClpP3 besitzt am N-Terminus ein konservierte Motiv (MPIG) für die Interaktion mit ClpC.

Vergleicht man die N-Termini von ClpP3 und ClpP1, ist das entscheidende Motiv, das für die Interaktion mit ClpC bei ClpP3 verantwortlich ist, im ClpP1-Protein nicht konserviert (siehe Abbildung 2.14, ClpP1), sodass eine Interaktion zwischen ClpP1 und ClpC über ein noch nicht bekanntes Motiv erfolgen müsste. Da einige Aminosäuren im N-Terminus der ClpP1-Proteine konserviert sind, könnte hier aber trotzdem die Interaktionsstelle mit dem ClpC-Protein liegen. Um das Interaktionsmotiv zu identifizieren, wäre die Analyse von ClpP1-Varianten mit einer Verkürzung am N-Terminus oder gezieltem Austausch von Aminosäuren vorstellbar. In einem *in vitro*-Degradationsversuch mit α -Casein könnte dann ein Verlust der Aktivität durch die fehlende Interaktion von ClpP1 mit ClpC detektiert werden.

3.6 NblA-Abbau

Mithilfe der funktionellen Clp-Protease konnte in dieser Arbeit zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass das NblA1/NblA2-Heterodimer, auch ohne ein Substrat, durch eine mit ClpC interagierende Clp-Protease abgebaut wird. Ein Abbau des Adapterproteins ohne ein Substrat ist auch schon aus *Bacillus*

subtilis bekannt, wo alle identifizierten Adapterproteine durch ClpC-ClpP abgebaut werden können [224, 232, 233, 234]. Diese Methode zur Kontrolle von Adapterproteinkonzentrationen erscheint sinnvoll. Ist kein Substrat mehr vorhanden, wird auch das Adapterprotein nicht mehr benötigt und durch die Clp-Protease abgebaut. Auch für NblA erscheint dies sinnvoll, denn NblA kann unter verschiedenen Bedingungen, wie z.B. Stickstoff- und Schwefelmangel [173] oder Starklicht [182], exprimiert werden. So ist keine aufwendige Regulation des NblA-Proteins notwendig, sondern die Kontrolle der NblA-Expression reicht aus um den PBS-Abbau zu regulieren.

Überraschenderweise konnte jedoch kein *in vitro*-Abbau der PBS durch die Protease gezeigt werden, obwohl diese nachweislich NblA erkannte (Abbildung 2.16 C). Auch der Versuch stattdessen das Apoprotein von PC (GST-CpcA) oder lösliche PBP aus *Synechocystis* 6803-Zellextrakt abzubauen schlug fehl, obwohl NblA1/NblA2 bewiesenermaßen an diese bindet (Abbildung 2.12). Über die Ursache, warum die PBS nicht zusammen mit dem Adapter NblA1/NblA2 abgebaut werden, kann nur spekuliert werden.

Ein möglicher Grund könnte eine fehlende Dephosphorylierung der Linkerproteine sein. So konnten Piven *et al.* (2005) *in vitro* durch Dephosphorylierung von Linkerproteinen eine Destabilisierung der PBS verursachen sowie in *Synechocystis* 6803 *in vivo* unter Starklicht und stickstofflimitierenden Bedingungen die Dephosphorylierung von Linkerproteinen beobachten. In *Nostoc* 7120 zeigte sich außerdem in frühen Heterozysten eine Degradation der PBS vom Kern hin zu den Stäbchen, während in vegetativen Zellen ein Abbau von den peripheren Stäbchen hin zum Kern erfolgte [178]. Demnach scheint die Steuerung des PBS-Abbaus nicht nur von NblA auszugehen, sondern ein weiterer Faktor daran beteiligt zu sein den Ke und Haselkorn in einer Phosphatase vermuteten.

Die reversible Phosphorylierung von Aminosäureresten ist ein universeller, regulatorischer Mechanismus, der strukturelle und funktionelle Veränderungen in einem Protein nach sich ziehen kann. So ist z. B. die Anpassung an unterschiedliche Lichtbedingungen in Pflanzen durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. Bei dem unter dem Begriff *state transition* bekannten Prozess interagiert ein mobiler Teil des Lichtsammelkomplexes II (LHCII) je nach Redoxzustand des Plastochinonpools mit PSI oder PSII. Liegt der Plastochinonpool hauptsächlich reduziert vor, wird der mobile Teil der LHCII durch die Thylakoidkinase STN7 phosphoryliert, dissoziiert vom PSII und assoziiert mit dem PSI [236, 237, 238, 239, 240, 241]. Ist der Plastochinonpool dagegen oxidiert, wird der LHCII durch die kürzlich identifizierte PPH1/TAP38 (Protein Phosphatase1/Thylakoid-associated Phosphatase38) dephosphoryliert und interagiert wieder mit dem PSII [242, 243]. In der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist ein großer Teil der Antennen an der *state transition* beteiligt und wird ebenfalls durch eine Kinase kontrolliert. Auch ist bekannt, dass die Phosphorylierung des D1-Proteins die Interaktion des D1-Dimers stabilisiert [244]

sowie die Dephosphorylierung des D1-Proteins und der LHCII in den Chloroplasten höherer Pflanzen den Abbau bzw. die Auswechslung der Komponenten zur Folge hat [245, 246, 247] .

Die Beteiligung einer Kinase und Phosphatase bei der Regulation von an der Photosynthese beteiligter Komponenten ist somit ein häufig genutzter Mechanismus und auch beim Abbau der PBS vorstellbar. Piven *et al.* konnten zeigen, dass die Dephosphorylierung der im PBS verborgenen Linker zu einer Destabilisierung der PBS führt. Allerdings war für die Dephosphorylierung eine Lockerung der PBS-Struktur erforderlich. Ein denkbare Szenario wäre demnach, dass NblA bei der Interaktion mit den PBS, wie von Dines *et al.* vorgeschlagen, als eine Art Keil in die Zwischenräume der PBS-Struktur vordringt und diese leicht auflockert. Dadurch könnte die Phosphatase an die Linker der PBS gelangen, diese dephosphorylieren und somit die dichtgepackten Struktur der PBS etwas lösen. Die leichte Disassemblierung könnte dann zu einer verbesserten Interaktion von NblA mit der Clp-Protease führen, die vorher, geschuldet durch ihre Größe, aufgrund der dichtgepackte Struktur der PBS sterisch nicht möglich war. Auch eine direkte Interaktion von NblA mit der Phosphatase wäre denkbar, in *Synechocystis* 6803 könnte NblA2 daran beteiligt sein. Allerdings ist zu beachten, dass Piven *et al.* *in vitro* eine vollständige Auflösung der PBS-Struktur aufgrund der Dephosphorylierung der Linkerproteine beobachtet konnten. Dies ist *in vivo* sehr unwahrscheinlich, da schon die Mutation der ClpC-Bindestelle im NblA₇₁₂₀-Protein den Abbau der PBS verhindert. Des Weiteren ist bei dieser These zu bedenken, dass die Expression von NblA unter einem phosphatinduzierten Promotor in *Synechococcus* 7942 ausreichte, um die PBS abzubauen [188] . Ist neben NblA also eine Phosphatase an dem Abbau beteiligt, müsste diese wie die Clp-Protease konstitutiv exprimiert werden.

Eine Phosphatase die die PBS vor deren Abbau dephosphoryliert erklärt allerdings nicht, warum NblA nicht den Abbau des PC-Apoproteins oder der PBP aus *Synechocystis* 6803-Zellextrakt durch die Clp-Protease vermitteln kann. Es scheint so, als könne NblA *in vitro* die „Übergabe“ des Substrates an die Protease nicht vermitteln.

Für das Adapterprotein MecB aus *Bacillus subtilis* ist bekannt, dass es nur durch Phosphorylierung aktiviert wird und dann mit MecA um die Bindung an ClpCP konkurriert [248] . Auch für NblA wäre dies eine denkbare Erklärung dafür, dass es den PBS-Abbau *in vitro* nicht vermitteln kann. Analysiert man die Struktur von NblA1 und NblA2 auf Phosphorylierungsstellen mithilfe von GPS 2.0 (*Group-based prediction system*) [249] , wird im NblA1 Ser₂₇ und im NblA2 Thr₃₂ als mögliche Aminosäure vorhergesagt, beide liegen sehr wahrscheinlich im Loop zwischen erster und zweiter α -Helix und wären somit einer Serin/Threoninkinase zugänglich. Analysiert man NblA₇₁₂₀ erhält man die in der C-terminalen Helix liegenden Aminosäuren Thr₄₇ und Tyr₄₈ als mögliche Phosphorylierungsstellen. Jedoch ist die Carboxylgruppe von Tyr₄₈ für die Stabilität des NblA₇₁₂₀-Dimers verantwortlich [192] , sodass die Aminosäurereste wahrscheinlich im Inneren des Proteins liegen und somit als

Phosphorylierungsstellen eher ungeeignet erscheinen. Um zu analysieren, ob NblA1 und NblA2 einer Regulation durch Phosphorylierung unterliegen, müsste man das native Heterodimer aus *Synechocystis* 6803-Zellextrakt isolieren und den Phosphorylierungszustand analysieren. Dies wäre durch eine Nano-LC(*Nanoscale liquid chromatography*)-gekoppelte Tandem-Massenspektroskopie (MS/MS) [250] denkbar, durch die schon der Phosphorylierungszustand von KaiC aus *Prochlorococcus marinus* untersucht werden konnte [251]. Auch die Analyse mittels einer Phos-Tag-SDS-PAGE wäre eine denkbare Methode um den Phosphorylierungszustand von NblA zu untersuchen [252]. Ist die Isolierung von NblA1/NblA2 aus *Synechocystis*-Zellextrakt etabliert, könnte das Heterodimer auch in einen PBS-Abbauversuch eingesetzt werden, um zu untersuchen ob postrtranslationale Modifikationen am NblA einen PBS-Abbau *in vitro* möglich machen.

3.7 Wird NblA posttranslational reguliert?

Abschließend wurde der nur eingeschränkt mögliche PBS-Abbau in der $\Delta glgA1/glgA2$ *Synechocystis* 6803-Mutante untersucht [209]. Dieser erfolgt trotz der Expression von NblA (Abbildung 2.19 B) nur innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Stickstoffentzug (Abbildung 2.19 A), um dann zu stoppen, während das NblA1/NblA2-Dimer akkumulierte (Abbildung 2.20 B).

Ein verzögerter PBS-Abbau infolge der Deletion von Stoffwechselgenen ist schon aus anderen Deletionsmutanten bekannt. So führte die Stilllegung der Alanin-Dehydrogenase (Ω ald-Mutante – (Lahmi *et al.*, 2006)) oder Phosphotransacetylase [253] zu einem verzögertem PBS-Abbau. In der Ω ald-Mutante konnte durch Lahmi *et al.* jedoch ein verringertes *nblA*-Transkriptlevel nachgewiesen werden. Als Ursache vermuteten sie eine veränderte 2-Oxoglutaratkonzentration aufgrund der fehlenden Alanin-Dehydrogenase, was ein geringeres NtcA-Level und somit eine verminderte Antwort auf Stickstoffstress zur Folge hätte.

Im Gegensatz zu der Ω ald-Mutante konnte in der $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante jedoch kein verändertes 2-Oxoglutaratlevel und sogar eine erhöhte Konzentration an NblA1- und NblA2-Protein nachgewiesen werden (Abbildung 2.19 B). Hier führt also nicht eine zu geringe Verfügbarkeit von NblA1/NblA2 zu dem verzögerten PBS-Abbau, sondern die Interaktion zwischen Clp-Protease und NblA scheint gestört, was an der Akkumulation von NblA1/NblA2 zu erkennen ist.

Mit der *sll1961*-defizienten *Synechocystis* 6803-Mutante ist eine weitere Mutante bekannt, die nur einen geringen Teil ihrer PBS abbaut, jedoch kein reduziertes *nblA*-Transkriptlevel aufweist [254]. Die *sll1961*-Mutante wurde im Rahmen einer *random*-Mutagenese durch ihre Reaktion auf Starklicht identifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Sll1961 vermutlich als potentieller Transkriptionsfaktor Einfluss auf die Stöchiometrie der Photosysteme nimmt [255]. Neben diesem Effekt konnten Sato *et al.* (2008) einen Einfluss von Sll1961 auf den PBS-Abbau unter Stickstoffmangelbedingungen beobachten, wobei unter diesen Bedingungen keine veränderte

Stöchiometrie der Photosysteme vorlag. Es wurde deswegen angenommen, dass Sll1961 in zwei voneinander unabhängigen Stressantworten eine Regulationsfunktion ausübt [254]. Zusätzlich konnte Sll1961 als positiver Regulator des Aquaporinproteins AqpZ identifiziert werden [256]. Deletiert man AqpZ vollständig kommt es zu Defekten im Metabolismus von Makronährstoffen, der pH-Homöostase und der Zellteilung unter photomixotrophen Bedingungen. Außerdem wird vermehrt Glykogen gebildet. Akai *et al.* gehen deswegen von einer essenziellen Rolle des AqpZ-Aquaporins im Glukosemetabolismus aus [256]. Jedoch war das Verhalten der $\Delta aqpZ$ -Mutante unter Stickstoffmangelbedingungen nicht Gegenstand der Untersuchungen durch Akai *et al.* Demnach kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob Sll1961, wie von Sato *et al.* angenommen, einen regulatorischen Effekt auf den PBS-Abbau hat, oder der Effekt durch den Einfluss auf das Protein AqpZ auftritt. Da die Deletion der Glykogensynthase-Gene in der $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante und die verminderte Expression von AqpZ in der $\Delta sll196$ -Mutante einen Einfluss auf den Glukosemetabolismus haben, könnte der verminderte PBS-Abbau vielleicht sogar auf einen ähnlichen Effekt zurückzuführen sein.

Über Ursachen für den Stopp des PBS-Abbaus kann nur spekuliert werden. Denkbar wäre eine unspezifische Reaktion aufgrund der Deletion von *glgA1* und *glgA2*. Wie schon beschrieben, kommt es aufgrund von Nährstoffmangel in *Synechocystis* 6803 zu dem Aufbau von Speicherstoffen wie Polyphosphat und Glykogen. Durch die Deletion der Glykogensynthase-Gene ist der Aufbau von Glykogen nicht mehr möglich, sodass eine Reihe von Kohlenstoffassimilaten und Zwischenprodukten des PBS-Abbaus in der Zelle akkumulieren und sogar C-Körper in Form von Pyruvat ins Außenmedium abgegeben werden [209]. Durch die hohe Konzentration an C-Körpern innerhalb der Zelle könnte es zu veränderten osmotischen Bedingungen oder einem Absinken des pH-Wertes kommen, was die Aktivität der Clp-Protease negativ beeinflussen könnte.

Trotzdem ist auch eine gezielte Regulation des Abbauprozesses vorstellbar, denn auch unter natürlichen Bedingungen kann ein gezielter Stopp des PBS-Abbaus wünschenswert sein. Beispiele für die aktive Regulation von Adapterproteinen durch sogenannte Anti-Adapterproteine sind auch aus anderen Organismen bekannt. So wird die Interaktion von MecA mit dem Substrat ComK durch die Interaktion von ComS mit MecA aufgehoben [208, 257] und auch in *E. coli* ist mit IraP ein Protein bekannt, das unter Phosphatmangel die Interaktion von dem Adapter RssB an RpoS verhindert, das so nicht durch ClpXP abgebaut werden kann [258, 259]. Neben diesen Anti-Adapterproteinen, die, soweit bekannt, die Interaktion von Substrat und Adapter inhibieren, wird die Interaktion von Adapter und Protease wie schon oben beschrieben durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. Da NblA nach 24 Stunden in den *Synechocystis* 6803-Mutanten akkumuliert, scheint die Interaktion zwischen Adapterprotein und Clp-Protease gestört und somit die Phosphorylierung ein möglicher Regulationsmechanismus.

Ein weiteres Argument für eine spezifische Regulation des PBS-Abbaus sind die Zellspektren ganzer Zellen der $\Delta glgA1/glgA2$ -Mutante, die NblA1-YFP und NblA2-Cer exprimiert. Anhand der Spektren wird deutlich, dass hier der PBS-Abbau nicht nach 24 Stunden stoppt, sondern noch ein kleiner Teil der PBS weiter abgebaut wird. Würde sich innerhalb der ersten 24 Stunden der pH-Wert so drastisch ändern, dass die Clp-Protease die PBS nicht mehr abbauen kann, sollte auch hier kein weiterer Abbau erfolgen. Wahrscheinlicher erscheint hier die Vermutung der Regulation durch ein Anti-Adapterprotein oder eine Phosphatase. Der noch erfolgende PBS-Abbau könnte hier durch die größere Menge NblA1/NblA2 erklärt werden, wodurch erstmals eine höhere Konzentration an Anti-Adapterprotein erreicht bzw. eine größere Menge an NblA1/NblA2 phosphoryliert werden müsste, um alle NblA-Proteine zu inaktivieren.

Um die gezielte Regulation des PBS-Abbaus nachzuweisen wären weitere Versuche nötig. Vorstellbar wäre die Expression eines NblA1- oder NblA2-GST-Fusionsproteins nach dem Vorbild der NblA-Fluorophor-Fusionsproteine *in trans* in der $\Delta glgA1/glgA2$ *Synechocystis* 6803-Mutante. Durch einen *ex-vivo-pulldown* nach dem Stopp des PBS-Abbaus könnte dann ein potentiell Anti-Adapterprotein zusammen mit NblA gereinigt werden. Auch eine Analyse des Phosphorylierungsstatus von NblA1/NblA2 wäre dann durch eine Phos-Tag-SDS-PAGE möglich.

3.8 Schlussbetrachtung

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass *Synechocystis* 6803 zwei für den PBS-Abbau essenzielle NblA-Proteine besitzt. Die biologisch aktive Form und die Funktionsweise des PBS-Abbaus waren jedoch nicht aufgeklärt. Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* und *in vitro* Interaktionsanalysen zeigten dann die Bildung eines Heterodimers als biologisch aktive Form, das mit PBP und ClpC interagiert. Erstmals konnte auch eine funktionelle ClpC-ClpP1/ClpR-Protease aus *Synechocystis* 6803 heterolog exprimiert und gereinigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind abschließend in der folgenden Abbildung zusammengefasst:

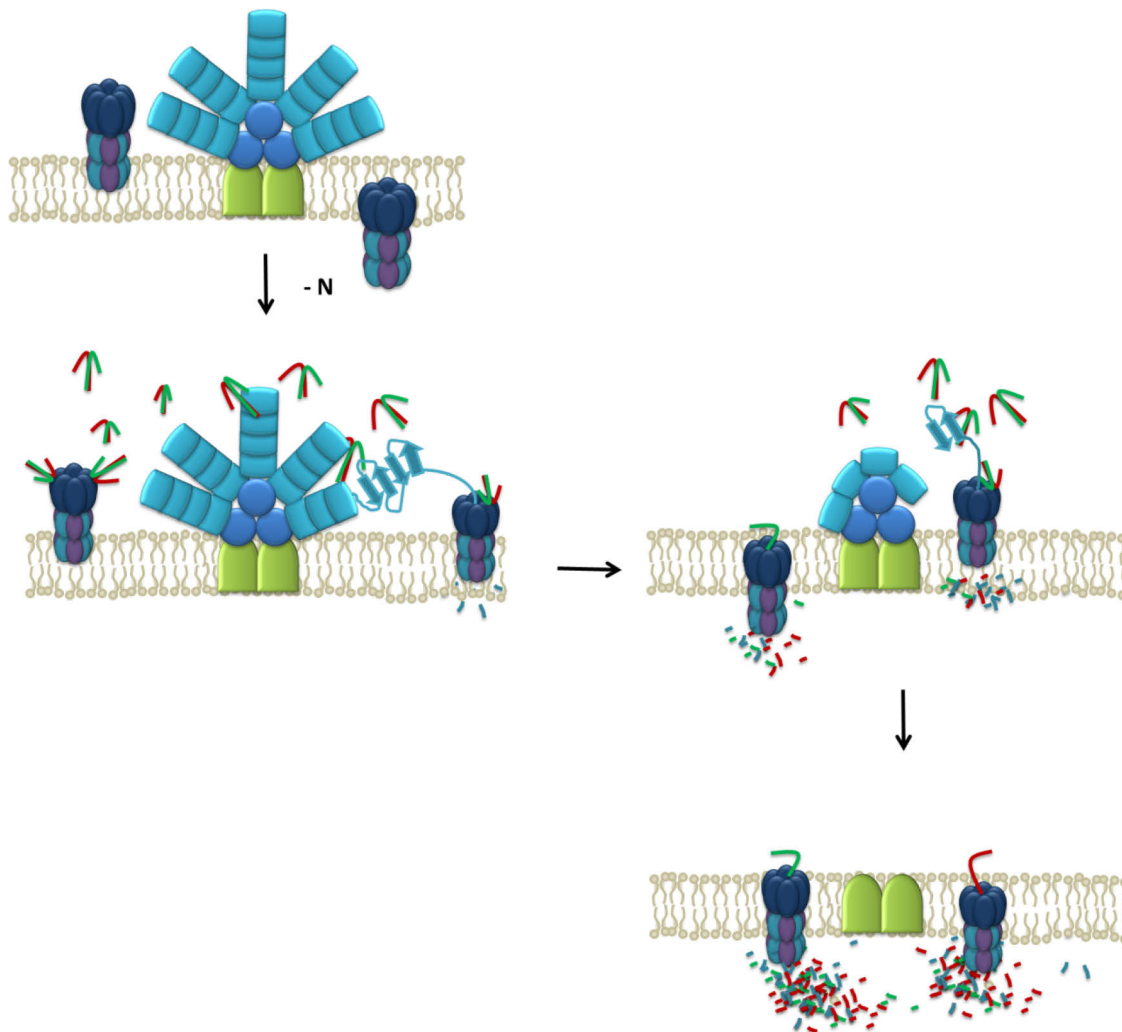


Abbildung 3.1: NblA1/NblA2-induzierter PBS-Abbau durch die Clp-Protease ClpC-ClpP1/ClpR. Unter Standardbedingungen sind die konstitutiv exprimierte Clp-Protease und die PBS vorhanden, jedoch erkennt die Protease die PBS nicht als Substrat. Erst unter Stressbedingungen, wie Stickstoffmangel, wird das NblA1/NblA2-Heterodimer exprimiert und bindet beide Proteine. Dadurch bringt es die PBS in räumliche Nähe zu der Clp-Protease, wodurch der Abbau der PBS erfolgt. Dabei wird das Heterodimer NblA1/NblA2 ebenfalls durch die Clp-Protease abgebaut, sodass bei einem Stopp der NblA1/NblA2-Expression die Dimer-Konzentration gemeinsam mit der des Substrates abnimmt. Noch vorhandenes NblA1/NblA2 wird nach dem vollständigen Abbau der PBS auch ohne Substrat degradiert.

Unter Standardkulturbedingungen sind die konstitutiv exprimierte Clp-Protease und die PBS zwar vorhanden, jedoch fehlt der Linker, der den Abbau vermitteln könnte. Unter Stickstoffmangel kommt es zu einer Expression von NblA1 und NblA2, die ein Heterodimer bilden. NblA1/NblA2 bindet dann an die PBS und ClpC und bringt diese in räumliche Nähe zur Clp-Protease. Dadurch kommt es zu einem von NblA1/NblA2 vermittelten PBS-Abbau, wobei NblA1/NblA2 gemeinsam mit dem Substrat degradiert wird. Demzufolge nimmt die Konzentration des Heterodimers bei einem Stopp der NblA1/NblA2-Expression gemeinsam mit der des Substrates ab. Steht kein Substrat mehr zur Verfügung, wird NblA1/NblA2 auch ohne dieses abgebaut. Ob für den Abbau der PBS zusätzliche eine Phosphatase nötig ist, oder NblA1/NblA2 posttranslational durch Phosphorylierung oder Interaktion mit einem Anti-Adapterprotein reguliert werden kann, bleibt offen und könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4. Material und Methoden

4.1 Material

In diesem Abschnitt sind verwendete Geräte und Materialien aufgeführt. Ausgenommen sind die üblichen Labormaterialien, wie z. B. Glas- und Reaktionsgefäße, Petrischalen, Parafilm und Sterilfilter.

4.1.1 Chemikalien

Die nachfolgende Tabelle listet die verwendeten Chemikalien auf.

Tabelle 4.1: Verwendete Chemikalien

Produkt	Hersteller
2-Propanol (100 %ig)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumeisen(III)-citrat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin (Na-Salz)	Roth, Karlsruhe
ATP, PEP	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bisacrylamid (BisAA)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Boehringer, Mannheim
Cobaltchlorid	Roth, Karlsruhe
Coomassie brilliant blue R-250	Serva, Heidelberg
Deoxycholat (DOC)	Roth, Karlsruhe
D-Glukose	Roth, Karlsruhe
di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Eisenammoniumcitrat	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (100 %ig, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (96 %ig, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-thio- β -D-Galaktopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kanamycin (Sulfat-Salz)	Roth, Karlsruhe
Kobalt(II)-nitrat (Hexahydrat)	Roth, Karlsruhe
Kupfersulfat (Pentahydrat)	Roth, Karlsruhe
LB-Agar (Lennox)	Roth, Karlsruhe
LB-Medium (Lennox)	Roth, Karlsruhe
LE-Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf

Magnesiumchlorid (Hexahydrat)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (Heptahydrat)	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol (99 %ig, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Methylviologen (MV)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Midori-Green	NIPPON GENETICS EUROPE GmbH, Düren
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Na-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriummolybdat	Roth, Karlsruhe
Natriumnitrat	Roth, Karlsruhe
Neomycin (Na-Salz)	Roth, Karlsruhe
N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin (Tricine)	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Roti-Blot A Anodenpuffer	Roth, Karlsruhe
Roti-Blot K Kathodenpuffer	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese 10x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 40 (19:1) Acrylamid/Bis-acrylamid	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 40 (29:1) Acrylamid/Bis-acrylamid	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Spectinomycin	Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tween20	Roth, Karlsruhe
Zinksulfat (Heptahydrat)	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe

4.1.2 Filter und Membranen

In dieser Arbeit zur Anwendung gekommenes Säulenmaterial sowie Filter, Membranen und sonstige Materialien sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Tabelle 4.2: Filter, Säulenmaterial, Membranen und sonstige Materialien

Produkt	Hersteller
Protran-Nitrozellulose Membran	Schleicher & Schull, Dassel
HybondTM N+-Membranen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HATF-Nitrozellulose Membranen	Schleicher & Schuell, Dassel

3MM-Filterpapier	Whatman Paper Ltd., Maidstone, GB
Steril-Filter (0,25 µm Porengroße)	Renner, Dannstadt
Nylon Net Filters (11 µm Porengroße)	Millipore, Bedford, USA
Röntgenfilme	GE Healthcare, , Waukesha, USA
Superdex™75 10/300GL	GE Healthcare, , Waukesha, USA
Superdex™200 10/300GL	GE Healthcare, , Waukesha, USA
Glutathion-Agarose	Macherey-Nagel, Düren
Ni-Ida-Resins	Macherey-Nagel, Düren
Glasperlen 0,1/0,25-0,5 mm	Roth, Karlsruhe
Nitratstäbchen	Merck, Darmstadt
Vivaspin 500, 5000 MWCO	Vivascience AG, Hannover

4.1.3 Molekulargewichtsmarker

Für die Elektrophorese verwendete Molekulargewichtsmarker sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Tabelle 4.3: Molekulargewichtsstandards

Standard	Hersteller
Proteinstandards:	
<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas bzw. neu: Fisher Thermo Scientific, Schwerte
<i>Native Marker Liquid Mix</i>	SERVA
DNA-Standards:	
<i>GeneRuler 50bp DNA Ladder</i>	Fermentas bzw. neu: Fisher Thermo Scientific, Schwerte
<i>GeneRuler 100bp DNA Ladder</i>	Fermentas bzw. neu: Fisher Thermo Scientific, Schwerte
λ -DNA/ <i>Cla</i> I	Fermentas bzw. neu: Fisher Thermo Scientific, Schwerte

4.1.4 Enzyme

In Tabelle 4.4 sind die verwendeten Enzyme sowie molekularbiologische Kits aufgeführt. Die für die Klonierungen verwendeten Restriktionsendonucleasen wurden von Fisher Thermo Scientific, (Schwerte) bezogen und sind nicht einzeln benannt.

Tabelle 4.4: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
CIAP (<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>)	Fermentas bzw. neu: Fisher Thermo Scientific, Schwerte
<i>DreamTaq</i> DNA-Polymerase	Fermentas bzw. neu: Fisher Thermo Scientific, Schwerte
<i>FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase</i>	Fermentas bzw. neu: Fisher Thermo Scientific, Schwerte
<i>Phusion High Fidelity</i> DNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
PreScission®-Protease	GE Healthcare, Waukesha, USA
RNase A	AppliChem GmbH, Darmstadt
T4-DNA-Ligase	Fermentas bzw. neu: Fisher Thermo Scientific, Schwerte
Pyruvat Kinase	Roche, Grenzach-Wyhlen
QIAGEN Plasmid Midi, Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange® site-directed mutagenesis kit	Stratagene, Heidelberg
pGEM-T Vector System I	Promega, Mannheim

4.1.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma Aldrich (Steinheim) bezogen und sind in Tabelle 4.5 aufgeführt. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Tabelle 4.5: verwendete Oligonukleotide

Primernamen	Sequenz
QCM23	CTTAGATTCTGGTCCCATATGGCATAGAGTTGCTATGTGTGCG
OCM24	CGACACATAGCAACTCTATGCCATATGGGAACCAGAATCTAAG
nblA-4	GACAGCAAGCTTATTTTTTGCC
#nbl7	GCAACACATATGAAACC
#nbl11	CCAAACAACATTGGGCTCGAGAGTTAG
#nbl14	GGAGTGCATCGCATGGTCAACAACG
#nbl21	GCCTAACCTAGAATTCGCTAG
#nbl24	GGAGTGCATCCATATGATCAACAACG
#nbl27	GCAACAACAAGAGTTTCTAGACCGGG
#nbl28	CCATATGGGGCCCCTGGAACAGAACTTCAGACCTAGGGGCTCCAG
#nbl31	ACATATGGGGCCCCTGGAACACAACCTTCAGGGGGAGGAGTGAATTTTC
#nbl32	CTTGAGGAATTCAGCTATG
#nbl36	ATATAGATCTGGGGAGGAGTGAATTT
#nbl37	GAGTTGTGCTACCATGGGAGTGAAT
#nblA1QCM1	GCGCCAGGCTCCCCTGGAGCCCATGGGTAAAGCACAGGCAGGC
#nblA1QCM2	GCCTGCCTGTGCTTAACCATGGGCTCCAGGGGAGCCTGGCGC
#nblA1QCM3	CGCCTTGAGGGCAACAGCCATGGAACCTGAATCCTTCGATCTCA
#nblA1QCM4	TGAGATCGAAGGATTCAGGTTCCATGGCTGTTGCCCTCCAAGGCG
#nblA2QCM1	GATTTGATGAAAAATCACTCCATATGTAGCACAACTCTAGGTTTAGG
#nblA2QCM2	CCTAAACCTAGAGTTGTGCTACATATGGAGTGAATTTTCATCAAATC
#nblA2QCM3	CATTTTTTCAGGAGTGCGATCCATATGATCAACAACGAAGCCTTAACC
#nblA2QCM4	GGTTAAAGGCTTCGTTGTTGATCATATGGATCGCACTCCTGAAAAAATG
#clpC3	GGATTAGCATATGTTGAACGC
#clpC5	GCTGGGGATCCTAATTATTCAAC
#clpC ₇₉₄₂ 1	GCAGGCCCGGGAGCTATGTTTGAACG
#clpC ₇₉₄₂ 2	CAACTTCCCGGGCTTAGTCAACGGCTTG
#cpcA1	GATACCGGATCCATGAAAACCC

#cpcA2	<u>GAATT</u> CAAAACTGACTAGCTCAG
#clpP1_1	GTAACAACACCCCATGGCCATGATTCC
#clpP1_2	GAGCTAAATACACCATGGAAATAGGGTC
#clpR_1	CAACCTGACCATATGGAAATAAC
#clpR_2	GAATGGAAACCTCGAGAATCACTG
#T7-Promotor-universal	TAATACGACTCACTATAGGG
#gfp_3	ATATAGATCTATGAGTAAAGGAGAAGAAC
#gfp_4	ATATCTCGAGTTATTGTATAGTTCATC
# CFP1	CGGTCGCCCATATGGTGAGCAAGGG
# CFP2	CCGCTTTACATATGCAGCTCGTCCATG
# YFP1	GGTCGCCACCATGGTGAGCAAG
# YFP2	CGCTTTCATGGACAGCTCGTCCATG

4.1.6 Antikörper

Die für Immunoblots verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4.6 aufgeführt.

Tabelle 4.6: verwendete Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Hersteller
Anti-NbIA ₇₁₂₀	Kaninchen IgG, Primärer Antikörper gerichtet gegen das NbIA-Protein aus <i>Nostoc</i> 7120, verd. 1:400	Baier, K., Institut für Biologie, Biochemie der Pflanzen, HU-Berlin
Anti-RbcL	Kaninchen IgG, Primärer Antikörper gerichtet gegen das RbcL-Protein, Reaktiv in Cyanobakterien, verd. 1:2000	Agisera, Vännäs, Schweden
Anti-KB1	Kaninchen IgG, Primärer Antikörper gerichtet gegen das NbIA1-Protein aus <i>Synechocystis</i> 6803, verd. 1:250	Baier, K., Institut für Biologie, Biochemie der Pflanzen, HU-Berlin
Anti-KB2	Kaninchen IgG, Primärer Antikörper gerichtet gegen das NbIA2-Protein aus <i>Synechocystis</i> 6803, verd. 1:250	Baier, K., Institut für Biologie, Biochemie der Pflanzen, HU-Berlin
anti-GFP	Kaninchen IgG, Primärer Antikörper gerichtet gegen das GFP-Protein aus <i>Aequorea victoria</i>	Agisera, Vännäs, Schweden
anti-IgG-Kaninchen-HRP-Konjugat	Ziege IgG, Sekundärer Antikörper gerichtet gegen invariable Ketten von Kaninchen IgG, konjugiert mit HRPeroxidase (HRP), 1:40.000	Perbio, Bonn

4.1.7 Geräte

Tabelle 4.7 zeigt die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Geräte.

Tabelle 4.7: Geräte

Geräte	Gerätetyp/Hersteller
Äkta™Purifier	GE Healthcare, Waukesha, USA
Agarose-Gele	PerfectBlue Gelsystem Mini S und M, PEQLAB Biotechnologie

	GMBH
Aquarien-Durchlüfterpumpe	Schego Optimal
Brutschrank	B 6200, Heraeus, Hanau
Flachbettschüttler	Celloshaker Variospeed, Renner GmbH, Dannstadt
Fluoreszenz-Lebenszeit-Spektrometer	FluoTime 200, PicoQuant, Berlin
Geldokumentationssysteme	Gel iX system, Intas, Göttingen
	Molecular Imager Gel Doc XR System, Biorad, München
Geltrockner	Gel Dryer 583, Bio-Rad, München
Kühlzentrifugen: Rotoren: SS 34, SLA-1000, SLA-1500	Sorvall, DuPont, Bad Homburg
Rotor: S4180 SS 15R	Beckmann, München
Laborwaagen	Basic, BP 310S, BP 1200, Sartorius AG, Göttingen
Magnetrührer	Heidolph MR 3000
Rotationsschüttler	Intelli Mixer RM-2M. ELMI Ltd., Riga, LV
Schwingmühle	Typ MM2, MM301, Retsch, Haan
<i>Semidry-Blotting-Apparatur</i>	<i>Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell</i> , Biorad München
Spektralfluorimeter	FluoroMax-4, Horiba, Potsdam
	<i>Novaspec III Visible Spectrophotometer</i> , GE Healthcare, Waukesha, USA
Spektrophotometer	<i>NanoDrop ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer</i> , Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
	Specord 200 plus, Analytic Jena, Jena
Spektropolarimeter	Jasco-715, Jasco Labor- und Datentechnik, Gross-Umstadt
SDS-PAGE	Mini-PROTEAN II, Bio-Rad, München
Spannungsquellen	Powerpac 300, Bio-Rad, München
Sterilwerkbank	Heraeus <i>Lamin Air</i> , Hanau
Thermoblock/ -mixer	Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler	T-Personal, Biometra, Göttingen
	Eppendorf 5415C, Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	Hettich, Zentrifugen Mikro 200R
Titan-Sonotrode/Kegelspitze KE76	Sonopuls, Bandelin
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls, Bandelin
Vortexer	Reax2000, Heidolph, Schwabach

4.1.8 Plasmide

Im Folgenden (Tabelle 4.8) sind die verwendeten Plasmide aufgeführt. Alle in dieser Arbeit hergestellten Plasmide wurden durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

Tabelle 4.8: verwendete Plasmide

Plasmid/Vektor	Beschreibung	Referenz
pJET 2.1	Klonierungsvektor	Fisher Thermo Scientific, Schwerte
pRL448	enthält das npt-Gen (C.K3-Kassette, Größe: 1100 bp); Amp ^r , Km ^r	[260]
pRL271	enthält das sacB-Gen; Cm ^r , Em ^r , in Cyanobakterien nicht replikationsfähig; Größe: 6347 bp	[164]
pRL528	Helferplasmid zur Konjugation von Cyanobakterien; Cm ^r	[261]
RP4	Helferplasmid zur Konjugation von Cyanobakterien; Amp ^r , Km ^r , Tc ^r	[261]
pIC20R	Klonierungsvektor; Amp ^r	[262]
pBluescript® II KS(+/-)	Klonierungsvektor; Amp ^r ; Größe: 2958 bp	Stratagene, La Jolla, USA
pGEX-6P-1	Expressionsvektor: Heterologe Expression eines Proteins mit N-terminalen GST-Tag; Amp ^r ; Größe: 4984 bp	GE Healthcare, Waukesha, WI
pGEX-2TK	Expressionsvektor: Heterologe Expression eines Proteins mit C-terminale GST-Tag; Amp ^r ; Größe: 4969 bp	GE Healthcare, Waukesha, WI
pGEX-2TK/NdeI	Expressionsvektor mit einer zusätzlichen NdeI-Schnittstelle	Karradt <i>et al.</i> , 2008
pACYCDuet-1	Vektor für die Koexpression von zwei Genen mit zwei multiplen Klonierungsstellen (MCS), Cm ^r , Größe 4008 bp	Novagen, Darmstadt
pCOLADuet-1	Vektor für die Koexpression von zwei Genen mit zwei multiplen Klonierungsstellen (MCS), Kan ^r , Größe 3719 bp	Novagen, Darmstadt
pACYC#GST	Vektor für die Koexpression von zwei Genen mit zusätzlichem <i>gst</i> in der MCS2	Diese Arbeit
pGEX#cpcA ₆₈₀₃	Expressionsvektor, enthält die Nukleotidsequenz zur heterologen Expression von <i>cpcA</i> mit N-terminalen GST-Tag	Diese Arbeit
pACYC#Nbla1_GST	Expressionsvektor, enthält die Nukleotidsequenz zur heterologen Expression von <i>nbla1-gst</i> (MCS2)	Diese Arbeit
pACYC#Nbla2_GST	Expressionsvektor, enthält die Nukleotidsequenz zur heterologen Expression von <i>nbla2-gst</i> (MCS2)	Diese Arbeit
pACYC#His_Nbla2, Nbla1_GST	Expressionsvektor, enthält die Nukleotidsequenzen von <i>his-nbla1</i> (MCS1) und <i>nbla1-gst</i> (MCS2) zur heterologen Koexpression	Diese Arbeit
pACYC#His_Nbla1, Nbla2_GST	Expressionsvektor, enthält die Nukleotidsequenzen von <i>his-nbla1</i> (MCS1) und <i>nbla2-gst</i> (MCS2) zur heterologen Koexpression	Diese Arbeit
pACYC#Nbla2, Nbla1_GST	Expressionsvektor, enthält die Nukleotidsequenzen von <i>nbla2</i> (MCS1) und <i>nbla1-gst</i> (MCS2)) zur heterologen Koexpression	Diese Arbeit

pACYC#ClpP1-His	Expressionsvektor, enthält die Nukleotidsequenzen zur heterologen Expression von <i>clpP1-his</i> (MCS1)	Diese Arbeit
pACYC#ClpP1-His, ClpR	Expressionsvektor, enthält die Nukleotidsequenzen von <i>clpP1-his</i> (MCS1) und <i>clpR</i> (MCS2) zur heterologen Koexpression	Diese Arbeit
pCOLA#His-NbIA1, NbIA2-GFP	Expressionsvektor, enthält die Nukleotidsequenzen von <i>his-nbIA1</i> (MCS1) und <i>nbIA2-gfp</i> (MCS2) zur heterologen Koexpression	Diese Arbeit
pEmYFP-N1	Klonierungsvektor, enthält die Nukleotidsequenz der monomeren Variante von YFP [Zacharias <i>et al.</i> , 2002]	Zur Verfügung gestellt durch Silvia Scolari [Scolari <i>et al.</i> , 2009; Engel <i>et al.</i> , 2010]
pEmCFP-N1	Klonierungsvektor, enthält die Nukleotidsequenz der monomeren Variante von CFP [Zacharias <i>et al.</i> , 2002]	Zur Verfügung gestellt durch Silvia Scolari [Scolari <i>et al.</i> , 2009; Engel <i>et al.</i> , 2010]
pEmCer-N1	Klonierungsvektor, enthält die Nukleotidsequenz der monomeren Variante von Cerulean [Zacharias <i>et al.</i> , 2002]	Zur Verfügung gestellt durch Silvia Scolari [Dissertation]
pET11a	Expressionsvektor	Novagen, Darmstadt
pET11a#nbIA	Expressionsvektor, enthält die Nukleotidsequenz zur heterologen Expression von <i>nbIA</i> ₇₁₂₀	Kerstin Baier
pET11a#nbIA1	Expressionsvektor, enthält die Nukleotidsequenz zur heterologen Expression von <i>nbIA1</i>	Kerstin Baier
pET11a#nbIA2	Expressionsvektor, enthält die Nukleotidsequenz zur heterologen Expression von <i>nbIA2</i>	Kerstin Baier
pET11#ClpC ₆₈₀₃	Expressionsvektor, enthält die Nukleotidsequenz zur heterologen Expression von <i>clpC</i> ₆₈₀₃	Diese Arbeit
pET15b	Expressionsvektor	Novagen, Darmstadt
pET22b	Expressionsvektor: zur Heterologe Expression eines Proteins mit His-Tag; Amp ^r ; Größe: 5493 bp	Novagen, Darmstadt
pET22b#His-ClpC	Expressionsvektor, enthält die Nukleotidsequenz zur heterologen Expression von <i>his-clpC</i>	Diese Arbeit
pET22#A1_YFP, A2	Klonierungsvektor, enthält Nukleotidsequenz zur Expression von NbIA-Fluorophor-Fusionsproteinen zusammen mit putativer Promotor- und Terminatorregion von <i>nbIA1</i> und <i>nbIA2</i> : P ₆₈₀₃ - <i>nbIA1_yfp</i> , <i>nbIA2</i> -T ₆₈₀₃	Diese Arbeit
pET22#A1_YFP, A2_Cer	Klonierungsvektor, enthält Nukleotidsequenz zur Expression von NbIA-	Diese Arbeit

	Fluorophor-Fusionsproteinen zusammen mit putativer Promotor- und Terminatorregion von <i>nblA1</i> und <i>nblA2</i> : P ₆₈₀₃ - <i>nblA1_yfp, nblA2_Cer</i> -T ₆₈₀₃	
pET22#A1, A2_Cer	Klonierungsvektor, enthält Nukleotidsequenz zur Expression von NblA-Fluorophor-Fusionsproteinen zusammen mit putativer Promotor- und Terminatorregion von <i>nblA1</i> und <i>nblA2</i> : P ₆₈₀₃ - <i>nblA1,nblA2_Cer</i> -T ₆₈₀₃	Diese Arbeit
pET22#A2_YFP, A2_Cer	Klonierungsvektor, enthält Nukleotidsequenz zur Expression von NblA-Fluorophor-Fusionsproteinen zusammen mit putativer Promotor- und Terminatorregion von <i>nblA1</i> und <i>nblA2</i> : P ₆₈₀₃ - <i>nblA2_yfp, nblA2Cer</i> -T ₆₈₀₃	Diese Arbeit
pET22#YFP_A1, A2	Klonierungsvektor, enthält Nukleotidsequenz zur Expression von NblA-Fluorophor-Fusionsproteinen zusammen mit putativer Promotor- und Terminatorregion von <i>nblA1</i> und <i>nblA2</i> : P ₆₈₀₃ - <i>yfp_nblA1-nblA2</i> -T ₆₈₀₃	Diese Arbeit
pET22#A1, Cer_A2	Klonierungsvektor, enthält Nukleotidsequenz zur Expression von NblA-Fluorophor-Fusionsproteinen zusammen mit putativer Promotor- und Terminatorregion von <i>nblA1</i> und <i>nblA2</i> : P ₆₈₀₃ - <i>nblA1-cer, nblA2</i> -T ₆₈₀₃	Diese Arbeit
pET22#YFP_A1, Cer_A2	Klonierungsvektor, enthält Nukleotidsequenz zur Expression von NblA-Fluorophor-Fusionsproteinen zusammen mit putativer Promotor- und Terminatorregion von <i>nblA1</i> und <i>nblA2</i> : P ₆₈₀₃ - <i>yfpnblA1-cernblA2</i> -T ₆₈₀₃	Diese Arbeit
pET22#P6803-NblA7120-T6803	Klonierungsvektor, enthält Nukleotidsequenz zur Expression von NblA-Fluorophor-Fusionsproteinen zusammen mit putativer Promotor- und Terminatorregion von <i>nblA1</i> und <i>nblA2</i> : P ₆₈₀₃ - <i>nblA₇₁₂₀</i> -T ₆₈₀₃	Diese Arbeit
pVZ321	Mobilisierbarer <i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression in <i>Synechocystis</i> 6803; Cm ^r und Km ^r Größe: 9601 bp	Zinchenko <i>et al.</i> , 1999
pVZ_SpSmr_AK	Mobilisierbarer <i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression in <i>Synechocystis</i> 6803; Cm ^r Km ^r und Sm ^r ,Sp ^r Größe: 1028 bp	A. Karradt
pVZ#NblA1_YFP, NblA2	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von NblA1_YFP, NblA2	Diese Arbeit
pVZ#NblA1_YFP, NblA2_Cer	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von A1_YFP, A2_Cer	Diese Arbeit
pVZ#NblA1, NblA2_Cer	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von NblA, NblA2_Cer	Diese Arbeit
pVZ#NblA2_YFP, NblA2_Cer	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von NblA2_YFP, NblA2_Cer	Diese Arbeit
pVZ#YFP_NblA1, NblA2	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von YFP_NblA1, NblA2	Diese Arbeit
pVZ#NblA1, Cer_NblA2	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von NblA1, Cer_NblA2	Diese Arbeit
pVZ#YFP_NblA1, Cer_NblA2	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von YFP_NblA1, Cer_NblA2	Diese Arbeit
pVZ#P6803-NblA7120-T6803	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von NblA ₇₁₂₀	Diese Arbeit
pVZ-Spec#NblA1_YFP, NblA2	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von NblA1_YFP, NblA2	Diese Arbeit
pVZ-Spec #NblA1_YFP, NblA2_Cer	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von A1_YFP, A2_Cer	Diese Arbeit

pVZ-Spec #NblA1, NblA2_Cer	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von NblA, NblA2_Cer	Diese Arbeit
pVZ-Spec #NblA2_YFP, NblA2_Cer	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von NblA2_YFP, NblA2_Cer	Diese Arbeit
pVZ-Spec #YFP_NblA1, NblA2	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von YFP_NblA1, NblA2	Diese Arbeit
pVZ-Spec #NblA1, Cer_NblA2	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von NblA1, Cer_NblA2	Diese Arbeit
pVZ-Spec #YFP_NblA1, Cer_NblA2	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von YFP_NblA1, Cer_NblA2	Diese Arbeit
pVZ-Spec /P6803-NblA7120-T6803	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von NblA ₇₁₂₀	Diese Arbeit
pRL1049	Mobilisierbarer <i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression in <i>Nostoc</i> 7120 Sm ^r ,Sp ^r	[263]
pRL1049#PnblAnblA ₇₁₂₀ T _{nblA}	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von NblA ₇₁₂₀	[187]
pRL1049#PnblAnblA ₇₁₂₀ (L7A)T _{nblA}	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von NblA ₇₁₂₀ (L7A)	[187]
pRL1049#PnblAnblA7120-gfpTnblA	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von NblA ₇₁₂₀ -GFP	Diese Arbeit
pRL1049#PnblAnblA ₇₁₂₀ (L7A)-gfpT _{nblA}	<i>shuttle</i> -Vektor zur Proteinexpression von NblA ₇₁₂₀ (L7A)-GFP	Diese Arbeit

4.1.9 Lösungen, Stammlösungen und Puffer

Die Zusammensetzung von Medien und Puffern sind im Methodenteil in den jeweiligen Abschnitten beschrieben. Wässrige Lösungen wurden entsprechend den Angaben unter Verwendung von A.-bidest angesetzt. Wenn ein anderes Lösungsmittel verwendet wurde ist dies vermerkt. Zudem ist vermerkt ob Lösungen filtriert oder autoklaviert wurden.

4.1.10 Mikroorganismen:

Folgende *E. coli*-Stämme wurden verwendet:

DH5α: Genotyp: *recA1, endA1, hsdR17(rk⁻, mk⁺), supE44, thi-1, gyrA96, relA, phoA (phi) 80d lacZ(ΔM15)Δ(lacZYA-argF)* U1690

Referenz: Hanahan [264]

Verwendung: Klonierungen

BL21 (DE3): Genotyp: *F⁻, ompT, hsdSB (rB-mB⁻), gal*

Referenz: Studier & Moffatt [265]

Verwendung: heterologe Expression von Proteinen

J53 (RP4): Genotyp: *R⁺, met, pro* (RP4: *Amp, Tc, Km, Tra⁺, IncP*)

Referenz: Wolk *et al.* [10]

Verwendung: Konjugation von *Nostoc* 7120 und *Synechocystis* sp. PCC 6803

HB101: Genotyp: *proA2, leu, hsdS20(rB mB), lacY1, recA1, 3 ara-14, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl, supE44, xyl-5, mtl-1*

Referenz: Sambroock [266]

Verwendung: Konjugation von *Nostoc* 7120

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Cyanobakterienstämme und Mutanten aufgeführt:

Tabelle 4.9: Verwendete Cyanobakterienstämme und -mutanten

Stämme	Beschreibung	Quelle oder Referenz
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	Wildtyp	
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 $\Delta nblA$	Insertion einer Kanamycin-Resistenzgenkassette in das <i>asr4517</i> -Gen (<i>nblA</i> ₇₁₂₀) von <i>Nostoc</i> 7120	[191]
$\Delta nblA$ NblA ₇₁₂₀ -GFP	$\Delta nblA$ -Mutante mit dem selbst replizierenden Vektor pRL1049, der die kodierende Sequenz von <i>nblA</i> ₇₁₂₀ - <i>gfp</i> sowie die Promotor- und Terminatorregion von <i>nblA</i> enthält	Diese Arbeit
$\Delta nblA$ NblA ₇₁₂₀ (L7A)-GFP	$\Delta nblA$ -Mutante mit dem selbst replizierenden Vektor pRL1049, der die kodierende Sequenz von <i>nblA</i> ₇₁₂₀ (L7A)- <i>gfp</i> sowie die Promotor- und Terminatorregion von <i>nblA</i> ₇₁₂₀ enthält	Diese Arbeit
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	Wildtyp	
<i>Synechocystis</i> 6803 $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante	Insertion einer Kanamycin-Resistenzgenkassette in das <i>sll0452</i> und <i>sll0453</i> -Gen (<i>nblA1</i> und <i>nblA2</i>) von <i>Synechocystis</i> 6803	[189]
<i>Synechocystis</i> 6803 $\Delta nblA2$	Insertion einer Kanamycin-Resistenzgenkassette in das <i>sll0453</i> -Gen (<i>nblA2</i>) von <i>Synechocystis</i> 6803	[189]
$\Delta nblA1/nblA2$ NblA ₇₁₂₀	$\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante mit autonom replizierenden pVZ 321, der die kodierende Sequenz von <i>nblA</i> ₇₁₂₀ sowie die Promotor und Terminatorregion von <i>nblA1/nblA2</i> enthält	Diese Arbeit
$\Delta nblA1/nblA2$ NblA1_YFP, NblA2_Cer	$\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante mit autonom replizierenden pVZ 321, der die kodierende Sequenz von <i>nblA1-yfp</i> , <i>nblA2-cer</i> sowie die Promotor und Terminatorregion von <i>nblA1/nblA2</i> enthält	Diese Arbeit
$\Delta nblA1/nblA2$ NblA, NblA2_Cer	$\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante mit autonom replizierenden pVZ 321, der die kodierende Sequenz von <i>nblA1</i> , <i>nblA2-cer</i> sowie die Promotor und Terminatorregion von <i>nblA1/nblA2</i> enthält	Diese Arbeit
$\Delta nblA1/nblA2$ NblA1_YFP, NblA2	$\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante mit autonom replizierenden pVZ 321, der die kodierende Sequenz von <i>nblA1-yfp</i> , <i>nblA2</i> sowie die Promotor und Terminatorregion von <i>nblA1/nblA2</i> enthält	Diese Arbeit
$\Delta nblA1/nblA2$ NblA2_YFP, NblA2_Cer	$\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante mit autonom replizierenden pVZ321, der die kodierende Sequenz von <i>nblA2-yfp</i> , <i>nblA2-cer</i> sowie die Promotor und Terminatorregion von <i>nblA1/nblA2</i> enthält	Diese Arbeit
$\Delta nblA2$ NblA2_YFP, NblA2_Cer	$\Delta nblA2$ -Mutante mit autonom replizierenden pVZ321, der die kodierende Sequenz von <i>nblA2-yfp</i> , <i>nblA2-cer</i> sowie die Promotor und Terminatorregion von <i>nblA1/nblA2</i> enthält	Diese Arbeit

<i>ΔnblA1/nblA2</i> YFP_NbIA1, Cer_NbIA2	<i>ΔnblA1/nblA2</i> -Mutante mit autonom replizierenden pVZ321, der die kodierende Sequenz von <i>yfp-nblA1</i> , <i>cer-nblA2</i> sowie die Promotor und Terminatorregion von <i>nblA1/nblA2</i> enthält	Diese Arbeit
<i>ΔnblA1/nblA2</i> NbIA1, Cer_NbIA2	<i>ΔnblA1/nblA2</i> -Mutante mit autonom replizierenden pVZ321, der die kodierende Sequenz von <i>nblA1</i> , <i>cer-nblA2</i> sowie die Promotor und Terminatorregion von <i>nblA1/nblA2</i> enthält	Diese Arbeit
<i>ΔnblA1/nblA2</i> YFP_NbIA1, NbIA2	<i>ΔnblA1/nblA2</i> -Mutante mit autonom replizierenden pVZ321, der die kodierende Sequenz von <i>yfp-nblA1</i> , <i>nblA2</i> sowie die Promotor und Terminatorregion von <i>nblA1/nblA2</i> enthält	Diese Arbeit
<i>Synechocystis</i> 6803 <i>ΔglgA1/glgA2</i> Mutante	Insertion einer Chloramphenicol-Resistenzgenkassette in das <i>sll0945</i> (<i>glgA2</i>) und Insertion einer Kanamycin-Resistenzgenkassette in das <i>sll1993</i> -Gen (<i>glgA2</i>) von <i>Synechocystis</i> 6803	[209]
<i>ΔglgA1/glgA2</i> NbIA1_YFP, NbIA2_Cer	<i>ΔglgA1/glgA2</i> -Mutante mit autonom replizierenden pVZ 321, der die kodierende Sequenz von <i>nblA1-yfp</i> , <i>nblA2-cer</i> sowie die Promotor und Terminatorregion von <i>nblA1/nblA2</i> enthält	Diese Arbeit
<i>ΔglgA1/glgA2</i> NbIA1, NbIA2_Cer	<i>ΔglgA1/glgA2</i> -Mutante mit autonom replizierenden pVZ 321, der die kodierende Sequenz von <i>nblA1</i> , <i>nblA2-cer</i> sowie die Promotor und Terminatorregion von <i>nblA1/nblA2</i> enthält	Diese Arbeit
<i>ΔglgA1/glgA2</i> NbIA1_YFP, NbIA2	<i>ΔglgA1/glgA2</i> -Mutante mit autonom replizierenden pVZ 321, der die kodierende Sequenz von <i>nblA1-yfp</i> , <i>nblA2</i> sowie die Promotor und Terminatorregion von <i>nblA1/nblA2</i> enthält	Diese Arbeit

4.2 Methoden

4.2.1 Mikrobiologische Standardmethoden

4.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte unter Standardbedingungen [267] entweder in flüssigem LB- (*lysogeny broth*)Medium im Schüttelinkubator, (37 °C, 200 rpm) oder auf LB-Agar-Festmedium im Brutschrank (37 °C, ü. N.).

Zur Selektion von plasmidtragenden Bakterienstämmen wurden dem LB-Medium nach Abkühlen unter 55 °C die entsprechenden Antibiotika zugefügt.

LB_Medium (Lennox)

LB-Agar (Lennox)

<u>Antibiotikum</u>	<u>Endkonzentration in $\mu\text{g ml}^{-1}$</u>
Ampicilin	100
Chloramphenicol	25
Spectinomycin	80
Streptomycin	30
Kanamycin	50

4.2.1.2 Kultivierung von *Nostoc 7120* und *Synechocystis 6803*

Die Anzucht beider Cyanobakterien erfolgte photoautotroph in BG-11-Medium [268] bei 28 °C. Für die Anzucht auf festem Medium wurden BG11-Platten mit 0,6 % Agar verwendet. Die Kolonien wurden mithilfe einer Impföse unter sterilen Bedingungen auf den Platten ausgestrichen und bei 28 °C unter Dauerbelichtung (ca. 50 $\mu\text{E/m}^2\text{s}$) angezogen.

Die Anzucht der Kulturen in Flüssigmedium erfolgte in BG11-Medium mit 20 mM NaNO_3 als Stickstoffquelle [269]. Das BG11-Medium wurde unter sterilen Bedingungen mit den entsprechenden Stämmen angeimpft. Die Anzucht erfolgte bei 28 °C und kontinuierlicher Belichtung mit Weißlicht (ca. 50 $\mu\text{E/m}^2\text{s}$). Dabei wurden die Kulturen entweder in Erlenmeyerkolben bei 100-150 rpm geschüttelt, oder in Glasfermentatoren, mit 2 % sterilem CO_2 in Luft begast.

Zur Selektion der verschiedenen Bakterienstämme wurden Antibiotika mit den unten aufgeführten Endkonzentrationen nach dem Abkühlen des Mediums unter 55 °C zugegeben. Für die Anzucht in stickstofffreiem Medium wurde BG11⁰-Medium anstelle von BG11 verwendet.

BG11-Medium:

10 ml	100 x BG11
10 ml	1 M TES, pH 8,0
6 g	Agar (nur für Platten)
1 ml	Na ₂ CO ₃ (20 mg/ml)
1 ml	K ₂ HPO ₄ (30 mg/ml)
ad 1 l mit A. bidest	
1 ml	Eisenammoniumcitrat (6 mg/ml)
5 ml	1 M NaHPO ₃ (nur für Platten)

100 x BG11:

149,58 g/l	NaNO ₃
7,49 g/l	MgSO ₄ x 7H ₂ O
3,6 g/l	CaCl ₂ x 2H ₂ O
0,3 g/l	Zitronensäure
0,56 ml/l	0,5 M Na-EDTA, pH 8,0
50 ml/l	Spurenelement-Mix

BG11⁰-Medium:

20 ml	50 x BG11 ⁰
10 ml	1 M TES, pH 8,0
6 g	Agar (nur für Platten)
1 ml	Na ₂ CO ₃ (20 mg/ml)
1 ml	K ₂ HPO ₄ (30 mg/ml)
ad 1 l mit A. bidest	
0,4 ml	Eisen-EDTA
5 ml	1 M NaHPO ₃ (nur für Platten)

50 x BG11⁰-Medium

3,74 g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
1,8 g/l	CaCl ₂ x 2H ₂ O
0,3 g/l	Zitronensäure
0,56 ml/l	0,5 M Na-EDTA, pH 8,0
50 ml/l	Spurenelement-Mix

Spurenelement-Mix:

2,86 g/l	H ₃ BO ₃
1,81 g/l	MnCl ₂ •x 4H ₂ O
0,22 g/l	ZnSO ₄ •x 7H ₂ O
0,39 g/l	Na ₂ MoO ₄ •x 2H ₂ O
0,08 g/l	CuSO ₄ •x 5H ₂ O
0,05 g/l	CoCl ₂ •x 6H ₂ O

Weitere Stammlösungen, sterilfiltriert

20 mg ml ⁻¹	Na ₂ CO ₃
6 mg ml ⁻¹	Ammonium Eisen(III)-citrat
30 mg ml ⁻¹	K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O
1 M	TES-Puffer (pH 8,0 NaOH)
	Eisen-EDTA

4.2.1.3 Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Flüssigkulturen erfolgte mithilfe eines Spektralphotometers (*Novaspec III Visible Spectrophotometer*, GE Healthcare) bei einer Wellenlänge von 600 nm für *E. coli*, bzw. 750 nm für *Synechocystis* 6803. Als Referenz diente das jeweilige Anzuchtmedium.

4.2.1.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen nach Hanahan

Für die Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurde die Rubidiumchlorid-Methode nach Hanahan [264] verwendet. Dafür wurden pro Erlenmeyerkolben 49 ml SOB-Medium mit 1 ml 50 x SOC-Medium versetzt und 1:100 mit einer entsprechenden ü. N.-Kultur angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 250 rpm auf einem Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 angezogen. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten auf Eis inkubiert und danach 5 Minuten bei 4 °C sedimentiert (3000 rpm, Beckman, Rotor S4180). Die geernteten Zellen wurden in 16 ml TBI aufgenommen und für mindestens 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer 5-minütiger Zentrifugationsschritt (4 °C; 2500 rpm, Beckmann, Rotor S4180), nach dem die Zellen in 2 ml TBII resuspendiert wurden. Die Zellsuspension wurde danach zügig zu je 200 bzw. 400 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

SOB-Medium:

20 g/l	Bactotrypton
5 g/l	Hefeextrakt
2 ml/l	5 M NaCl
2,5 ml/l	1 M KCl

50 x SOC-Medium

1 M	Glukose
0,5 M	MgSO ₄
0,5 M	MgCl ₂

TBI:

100 mM	RbCl ₂
50 mM	MnCl ₂
10 mM	CaCl ₂
10 % (v/v)	Glycerin
30 mM	1 M Kaliumacetat, pH 5,8
10 mM	MOPS (pH 7,0)

TBII:

10 mM	RbCl ₂
75 mM	CaCl ₂
15 % (v/v)	Glycerin

4.2.1.5 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Hitzeschock-Transformationsmethode nach Hanahan (1983). Dafür wurden chemisch kompetente *E. coli*-Zellen der Stämme DH5α bzw. BL21 (DE3) verwendet. Die tiefgefrorene Zellsuspension wurden eine halbe Stunde auf Eis aufgetaut. Je 20 µl Ligationsansatz (siehe Abschnitt 4.2.3.9), was ca. 50-100 ng Plasmid-DNA entsprach, wurden 200 µl Zellsuspension verwendet. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen 2 Minuten bei 42 °C im Wasserbad (Hitzeschock) und dann weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 800 µl steriles LB-Medium zu der Zellsuspension gegeben. Um die Antibiotikaresistenz des Plasmids auszubilden, wurde der Ansatz 60 Minuten bzw. 120 Minuten (für eine spätere Selektion

auf Cm) bei 37 °C und 250 rpm auf einem Flachbettschüttler geschüttelt. Je nach der zu erwartenden Transformationseffizienz wurden 1/10 oder der gesamte Ansatz auf einer LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und ü. N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

4.2.1.6 Konjugation von *Nostoc* 7120 und *Synechocystis* 6803

Bei der Konjugation von Cyanobakterien bedient man sich dem natürlichen Mechanismus des konjugativen Gentransfers für die Übertragung von Plasmid-DNA. Bei der Konjugation findet ein Transfer der Plasmide von einer Donor- in eine Rezipientenzelle durch Zellkontakt über eine Konjugationsbrücke statt.

Nach der Methode von Wolk *et al.* [10] benötigt man neben dem Rezipienten- (*Nostoc* 7120 bzw. *Synechocystis* 6803) einen Helferstamm (*E. coli* J53 mit RP4) und einen Donorstamm (*E. coli* HB101 mit pRL528). Wobei der Donorstamm nur für *Nostoc* 7120 zur Anwendung kam. Bei Konjugationen mit *Synechocystis* 6803 wurden gleich die plasmidtragenden DH5α-Zellen verwendet.

Das Helferplasmid pRL528 kodiert für Enzyme, die durch Methylierung der *Ava*I und *Ava*II-Schnittstellen den konjugativ in das Cyanobakterium übertragenen Vektor (Cargo-Plasmid) vor Restriktionsabbau schützen. Das konjugative Plasmid RP4 enthält die genetische Information (*tra+*, *IncP*) für alle bei der Konjugation benötigten Komponenten. Durch dieses Plasmid wird das Cargo-Plasmid mobilisiert und kann über den *rolling-circle*-Mechanismus übertragen werden.

Vorbereitung:

Als Ausgangsplasmid für die Konjugation diente in *Nostoc* 7120 das Cargo-Plasmid pRL1049 (Tabelle 4.8), das in diesem Organismus autonom repliziert. In *Synechocystis* 6803 hingegen wurde der autonom replizierende Vektor pVZ321 (Tabelle 4.8) verwendet. In die jeweilige *multiple cloning site* wurde das gewünschte *Insert* kloniert und *E. coli* HB101-Zellen mit den resultierenden Plasmiden (Tabelle 4.8) transformiert (siehe Punkt 4.2.1.5). Im Anschluss wurde LB-Medium (inkl. Antibiotika) mit den *E. coli*-Stämmen HB101 und J53 angeimpft und ü. N. bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Pro zu konjugierendem Plasmid wurden 10 ml LB-Medium (inkl. Antibiotika) 1:40 mit der ü. N. gewachsenen Kultur des *E. coli*-Stammes HB101 bzw. J53 in einem 125 ml Erlenmeyerkolben angeimpft. Nach 2,5 Stunden Wachstum bei 37 °C und 250 rpm wurden die Zellen sedimentiert (10 min, 4800 rpm, Beckmann, Rotor S4180, RT) und in 10 ml LB-Medium resuspendiert. Die den Donorstamm enthaltenden Kulturen wurden ein weiteres Mal unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden anschließend mit 10 ml der Kultur des J53-Helferstamms vereinigt und resuspendiert. Die Zellen der nun gemischten Ansätze wurden ein weiteres Mal sedimentiert (10 min, 4800 rpm, Beckmann, Rotor S4180, RT) und die geernteten Zellen in 200 µl LB-Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 2,5 Stunden bei 30 °C inkubiert, damit die

Übertragung des konjugativen Plasmids RP4 aus dem Helferstamm in den Donorstamm erfolgen konnte.

Nostoc 7120: Die $\Delta nblA$ -Mutante von *Nostoc* 7120 wurde in einem Erlenmeyerkolben mit 100 ml BG11-Medium und 150 $\mu\text{g/ml}$ Neomycin bei 28 °C unter konstantem Schütteln angezogen. Im Anschluss wurde die Konzentration von Chl *a* in der Kultur bestimmt (Abschnitt 4.2.4.4). Pro Konjugation wurden so viele Zellen geerntet, dass sie 10 μg Chl *a* entsprachen. Um die Kettenlänge der *Nostoc* 7120-Mutanten auf ca. 3-4 Zellen pro Kette zu verkürzen wurden sie mehrmals kurz im Ultraschallbad geschwenkt und die Kettenlänge unter dem Mikroskop überprüft. Die Kultur wurde anschließend sedimentiert (3 min, 4800 rpm, Beckmann, Rotor S4180, RT) und das enthaltene Antibiotikum durch dreimaliges Waschen mit 20 ml BG11-Medium (3 min, 4800 rpm, Beckmann, Rotor S4180, RT) entfernt. Die geernteten Zellen wurden in 200 μl BG11-Medium pro 10 μg Chl *a* aufgenommen.

Synechocystis 6803: Die verwendeten *Synechocystis* 6803-Kulturen wurden in einem Erlenmeyerkolben mit 50 ml BGII und entsprechenden Antibiotika (Tabelle 4.9) unter konstantem schütteln unter Dauerlicht angezogen. Im Anschluss wurden sie sedimentiert (3 min, 4800 rpm, Beckmann, Rotor S4180, RT), enthaltenes Antibiotikum durch dreimaliges Waschen mit 150 ml BG11 Medium entfernt und die gewaschenen Zellen auf eine OD_{750} von 0,6-0,8 eingestellt.

Konjugativer Gentransfer:

Für die Übertragung des Cargo-Plasmids wurden 200 μl der Cyanobakterienkultur mit 200 μl der *E. coli* –Kultur (HB101 bzw. DH5 α und J53) vermischt. Je 200 μl dieser Mischkultur wurden auf einen HATF-Filter, der auf einer BG11-Platte ohne Antibiotikum auflag, gegeben und mit einer sterilen Impföse ausgestrichen. Die Platten wurden ü. N. im Dunkeln bei 28 °C und ab dem folgendem Tag bei mittleren Lichtbedingungen ($<50 \mu\text{E/M}^2\text{s}$) inkubiert. Nach 24 Stunden Anzucht wurden die Filter auf BG11-Platten mit entsprechenden Antibiotika (Tabelle 4.9) und während des Wachstums der Zellen einmal wöchentlich auf „frische“ BG11-Platten mit Antibiotika überführt.

4.2.1.7 Stickstoffentzug aus dem Medium

Nostoc 7120: Für die Untersuchung von *Nostoc* 7120-Mutanten unter Stickstoffmangelbedingungen, wurden die Zellen wie unter 4.2.1.2 beschrieben mit Glasfermentatoren in BG11-Medium und entsprechenden Antibiotika angezogen. Die Kulturen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase durch Filtration mit einen 11 μm Nylon Net Filter (Millipore) geerntet. Um den gebundenen Stickstoff zu entfernen wurden die Zellen mit dem zweifachen Kulturvolumen an BG11⁰-Medium gewaschen. Eventuelle Stickstoffrückstände wurden durch Nitratteststäbchen (Merck, Darmstadt) detektiert und durch Zugabe von weiterem BGII⁰-Medium entfernt. Im Anschluss wurden die Kulturen in BGII⁰-

Medium resuspendiert und mit Glasfermentatoren in BG11⁰-Medium und entsprechenden Antibiotika auf einen Chl *a*-Gehalt von 6 µg/ml eingestellt.

Synechocystis 6803: Für die Untersuchung von *Synechocystis* 6803-Mutanten unter Stickstoffmangelbedingungen wurden die Bakterien ebenfalls wie unter 4.2.1.2 beschrieben mit Glasfermentatoren in BG11-Medium mit entsprechendem Antibiotika angezogen. Sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 4.000 rpm, Sorvall, Rotor SLA 1000, RT) sedimentiert. Enthaltener Stickstoff wurde durch dreimaliges Waschen mit 200 ml BG11⁰ entfernt (10 min, 4.000 rpm, Sorvall, Rotor SLA 1000, RT). Eventuell enthaltene Stickstoffrückstände wurden durch Nitratteststäbchen (Merck, Darmstadt) detektiert und durch einen weiteren Waschschrift mit BG11⁰-Medium entfernt. Im Anschluss wurden die Kulturen in BG11⁰-Medium resuspendiert und mit Glasfermentatoren in BG11⁰-Medium und entsprechenden Antibiotika auf einen OD₇₅₀ von 0,3 eingestellt.

4.2.2 Allgemeine Methoden

4.2.2.1 Absorptionsspektren ganzer Zellen

Absorptionsspektren ganzer Zellen von *Synechocystis* 6803- und *Nostoc* 7120-Kulturen wurden in BG11-Flüssigmedium im Wellenlängenbereich von 400 bis 750 nm mit einem Spektralphotometer (Specord 200 plus, Analytic Jena) aufgenommen. Als Referenz diente das Anzuchtsmedium.

Um das Phycocyanin zu Chl *a*-Verhältnis zu veranschaulichen, wurden die Spektren auf eine OD von 1 bei der den Chl *a*-Gehalt widerspiegelnden Wellenlänge (ca. 665 nm) normiert. Dazu wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{OD_{400} - OD_{700}}{OD_{665} - OD_{700}} \quad \text{Formel 4.1}$$

4.2.2.2 Emissionsspektren

Die Aufnahme von Emissionsspektren erfolgte an einem Spektralfluorimeter (FluoroMax-4, Horiba). Dafür wurden lebende *Synechocystis* 6803-Zellen mit einer OD von 0,3 in Einwegküvetten (aus optisch klarem Polystyrol) vermessen. Die Anregung von Cer erfolgte bei 458 nm und die Emission wurde im Wellenlängenbereich von 500-600 nm detektiert. Die Anregung von GFP erfolgte bei 385 nm und die Emission wurde in einem Bereich von 450-600 nm verfolgt. Um die Emission der PBS zu detektieren, wurden diese bei 585 nm angeregt und die Emission im Bereich von 600-700 nm gemessen.

4.2.2.3 Lebenszeitmessung von Cer

Für die Bestimmung der Lebenszeit wurde das Abklingen des Fluoreszenzsignals (*decay*) mit einem Fluoreszenz-Lebenszeit-Spektrometer (FluoTime 200 – PicoQuant) mit der TCSPC(*time-correlated*

single-photon counting)-Technik bestimmt. Dafür wurde Cer bei 475 nm mit einer Pulsaserdiode angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wurde mit einer Photodiode (*single-photon avalanche photodiode*) detektiert. Um das Streulicht zu minimieren wurde ein optischer Filter (470±15nm) verwendet. Die spektroskopischen Lebenszeitmessungen wurden mit lebenden *Synechocystis* 6803-Zellen mit einer OD₇₅₀ von 0,3 8 Stunden nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium in einer Quarzküvette durchgeführt. Da nur ein Photon pro 100 Laserpulse (1 *count*) registriert wird, wurden die Messungen bis zu einer Detektion von 1.0000 *counts* wiederholt und die gemessene Zeitdifferenz in ein Diagramm aufgetragen. Jede Messung erfolgte aus statistischen Gründen sieben Mal, alle sieben Messungen wurden anschließend zusammengefasst. Dafür wurden die einzelnen Kurven nach der nichtlinearen Methode der kleinsten Quadrate (Fluofit-PicoQuant) mit zwei exponentiellen Termini gefittet. In das Fitting wurde außerdem die „Responsefunktion“ des Gerätes (*instrument response function*-IRF) mit einbezogen.

4.2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem konfokalen Laserscanmikroskop (Leica) durchgeführt. Die Anregung von GFP erfolgte bei 488 nm mit einem Argonlaser und die Emission wurde in einem Wellenlängenbereich von 500 – 540 nm detektiert. Die PBS-Fluoreszenz wurde durch Verwendung eines Rhodamin-Filter-Sets (Ex: 555/28, Em: 617/73) detektiert.

4.2.2.5 BLAST-Analyse

Die BLAST-Analyse zur Identifizierung der proteolytischen Clp-Untereinheiten erfolgte mithilfe des BLAST-Tools der NCBI-Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Bei dem ausgewählten Protein-Protein-BLAST (blastp) wurden die kodierenden Aminosäuresequenzen der *clpP*-Gene aus *Synechococcus* 7942 mit der NCBI-Proteindatenbank (*protein blast*, Database: *PDB protein database*) alignt.

4.2.2.6 Multiples Sequenzalignment

Die verwendeten Sequenzen wurden der Cyanobase entnommen (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>). Das Alignment wurde mit dem Programm Clustal Omega [270, 271] erstellt und mithilfe des Programms GeneDoc [272] bearbeitet.

4.2.2.7 Identifizierung von möglichen Phosphorylierungsstellen im NblA-Protein.

Die Identifizierung von Phosphorylierungsstellen erfolgte mit dem webbasierten Programm GPS 2.0 (<http://gps.biocuckoo.org/>) nach Xue *et al.* [249] .

4.2.3 Molekularbiologische Methoden

4.2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA (Minipräparation) wurde nach dem Prinzip der „Alkalischen Lyse“ [273] durchgeführt.

Für die Minipräparation wurden 4-5 ml einer LB-ü. N.-Kultur zentrifugiert (5 min, 5.000 rpm, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge) und das Pellet in 300 µl P1-Puffer resuspendiert. Dazu wurden 300 µl P2-Puffer gegeben und der Ansatz mehrmals behutsam geschwenkt. Um die Zellen vollständig aufzuschließen und die enthaltenen Proteine sowie die chromosomale DNA zu denaturieren wurde der Ansatz 5 Minuten inkubiert. Nachdem Zellaufschluss wurden 300 µl P3-Puffer zugegeben und durch mehrmaliges Schütteln des Eppendorf-Gefäßes untergemischt. Durch zehnminütiges Zentrifugieren (14.000 rpm, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge) wurden die denaturierten Proteine, sowie die chromosomale DNA sedimentiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 0,7 Volumen Isopropanol und 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,2 versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (30 min, 14.000 rpm, 4 °C, Hettich-Tischzentrifuge) wurde der Überstand verworfen und das gefällte Plasmid-DNA-Pellet mit 900 µl 70 % unvergälltem Ethanol gewaschen. Nach zehnminütiger Zentrifugation (14.000 rpm, 4 °C, Hettich-Tischzentrifuge) wurde das erhaltene DNA-Pellet getrocknet und in der Regel anschließend in 50 µl MQ-Wasser aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Um Plasmid-DNA für Sequenzierungen zu erhalten wurde der Ansatz mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits nach den Angaben des Herstellers nachgereinigt oder für die Minipräparation das QIAGEN Spin Miniprep Kit, QIAGEN verwendet.

P1 (Resuspensionspuffer):	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	10 mM	EDTA, pH 8,0
P2 (Lysispuffer):	200 mM	NaOH
	1% (w/v)	SDS
P3 (Neutralisationspuffer):	3 M	Kaliumacetat, pH 5,5

4.2.3.2 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der PCR [274] wurden definierte Abschnitte eines DNA-Stranges *in vitro* vervielfältigt.

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurden zwei Polymerasen verwendet. Für die Synthese möglichst fehlerfreier PCR-Produkte für anschließende Klonierungen und *in vitro*-Transkriptionen wurde - aufgrund ihrer Korrekturlesefunktion (*proof-reading*) - die *Phusion High Fidelity DNA Polymerase* (NEB) verwendet. Für analytische Anwendungen, bei denen Sequenzfehler nicht von

Bedeutung sind, wie z. B. einer Kolonie-PCR, wurde die DreamTaq Polymerase (MBI Fermentas) verwendet. Als Matrize dienten genomische DNA, Plasmid-DNA oder unaufgeschlossenes Zellmaterial. Die PCR-Bedingungen wurden nach den Angaben der Hersteller und den berechneten Schmelztemperaturen der jeweiligen Primerpaare gewählt (Programm: Oligocalc <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

4.2.3.3 Ortsgerichtete Mutagenese nach Wang und Malcom (2002)

Zum Einfügen von Schnittstellen oder zum Austausch von Aminosäuren wurden ortsgerichtete Mutagenesen nach Wang und Malcom [275] durchgeführt, die es ermöglichen ein oder mehrere Nukleotide in einem DNA-Abschnitt zielgerichtet auszutauschen.

Die Basenaustausche erfolgten mithilfe des *Quick-Change® Site-Directed Mutagenesis Kits* von Stratagene (Heidelberg) nach Angaben des Herstellers.

4.2.3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der DNA wurde spektrophotometrisch bei 260 nm mithilfe des *NanoDrop ND-1000* UV/Vis-Spektralphotometers (PeqLab) durch den Extinktionskoeffizienten ($50 \text{ ng} \cdot \text{cm} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) für doppelsträngige DNA nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz bestimmt. Für die Messungen wurde je ein Volumen von 1 μl eingesetzt.

Weiterhin konnte mit dem Verhältnis A_{260}/A_{280} eine qualitative Aussage über die DNA gemacht werden. Proteine (Tryptophan, Tyrosin) absorbieren maximal bei 280 nm. Im DNA/Protein-Gemisch verschiebt sich in Anwesenheit von Proteinen folglich das Absorptionsmaximum in Richtung 280 nm. Dadurch kann mithilfe des Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm eine Aussage über die Reinheit der Probe getroffen werden. In Abwesenheit von Protein liegt der Quotient von A_{260}/A_{280} zwischen 1.8-2.0.

4.2.3.5 DNA-Spaltung mithilfe von Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen spalten Phosphodiesterbindungen des Zucker-Phosphat-Rückgrates der DNA in oder in der Nähe von spezifischen Erkennungssequenzen.

Der Restriktionsverdau wurde analytisch sowie für Klonierungen verwendet. Für einen Verdau wurden 1–5 μg DNA eingesetzt. In der Regel wurden 5 U Enzym pro μg DNA verwendet. Die Reaktionen erfolgten in den vom Hersteller empfohlenen Puffern und Bedingungen.

4.2.3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nukleinsäuren können aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrates nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt werden. Mithilfe eines DNA-Molekulargewichtsmarkers kann dabei die Größe der DNA-Fragmente bestimmt werden.

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten wurden je nach Größe des DNA-Fragments 0,8-1,5 %ige Agarosegele verwendet. Dafür wurde die entsprechende Agaroselösung in 1 x TBE hergestellt und für die Detektion der DNA-Moleküle Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml) oder MidoriGreen (2 µl auf 100 ml TBE) zugesetzt. Vor dem Lauf wurden die zu analysierenden DNA-Proben mit 10 x Ladepuffer versetzt. Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 3-5 V pro cm Elektrodenabstand angelegt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch UV-Licht in einem Geldokumentationssystem (*Gel iX system*, Intas) sichtbar gemacht und gegebenenfalls ausgeschnitten.

Die Elution und Reinigung ausgeschnittener DNA-Fragmente erfolgte mithilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers.

10 x TBE: Rotiphorese 10x	TBE
10 x DNA-Ladepuffer: 60 % (v/v)	Glycerin
20 mM	EDTA, pH 8,0
0,3 % (w/v)	Bromphenolblau
0,3 % (w/v)	Xylencyanol

4.2.3.7 Erzeugung von 3'-Einzelüberhängen durch Adenylierung

PCR-Fragmente, die mit der Phusion-Polymerase amplifiziert werden, besitzen glatte Enden (*blunt ends*). Für die Ligation in Vektoren mit U- bzw. T-Überhängen benötigt man jedoch A-Überhänge (*sticky ends*) an den PCR-Fragmenten. Diese wurden mithilfe der *Taq*-Polymerase nachträglich erzeugt. Dafür wurden 1 x *Taq*-Puffer, 0,2 mM dATP und 5 Units *Taq*-Polymerase mit dem gereinigtem PCR-Produkt in einem 0,5 ml Eppendorf-Gefäß bei einem Reaktionsvolumen von 60 µl für 1 Stunde bei 72 °C im Thermocycler inkubiert.

4.2.3.8 Dephosphorylierung des 5'-Endes von liniarisierten Vektoren

Bei der Ligation (siehe Abschnitt 4.2.3.9) ist die Rezirkularisierung des liniarisierten Vektors gegenüber der Integration von Fremd-DNA begünstigt, wenn das Plasmid nur durch eine Restriktionsendonuklease geschnitten wird. Um dies zu verhindern, wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen der restringierten Vektor-DNA durch Behandlung mit *FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Fermentas) nach dem Protokoll des Herstellers entfernt.

4.2.3.9 Ligation

Mithilfe einer Ligase wird bei einer Ligation das 3'-Hydroxy- und das 5'-Phosphat-Ende zweier Nukleinsäuren zu einer Phosphodiesterbindung verknüpft, dies entspricht auch der natürlichen Funktion der Ligase, die als Reperaturenzym für DNA-Einzelstrangbrüche fungiert.

Mit einem oder zwei Restriktionsenzymen geschnittene Vektoren und DNA-Fragmente (*Inserts*), die durch den Verdau kompatible Enden besitzen, können mithilfe einer Ligase verknüpft werden. Dabei kann die Menge an *Insert*, die eingesetzt werden soll durch folgende Formel berechnet werden:

$$ng\ Insert = \frac{ng\ Vektor \times Gr\ddot{o}\ddot{e}\ddot{e}\ Insert\ [kb]}{Gr\ddot{o}\ddot{e}\ddot{e}\ Vektor\ [kb]} \times \text{Verh\ddot{a}ltnis} \frac{Insert\ (3)}{Vektor\ (1)} \quad \text{Formel 4.2}$$

Ligationen wurden mithilfe der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) durchgeführt. Dabei wurde das Puffersystem des Herstellers verwendet. In einem 20 µl Ansatz wurden neben 50 ng Vektor und der berechneten Menge an Insert, 2 µl 10 x T4-DNA-Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase eingesetzt und auf 20 µl mit MQ-Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde entweder 1 Stunde bei RT, 4-5 Stunden bei 18 °C oder ü. N. bei 16 °C inkubiert.

4.2.3.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen erfolgten nach der Methode von Sanger *et al.* [276] und wurden von der Firma DLMBC im Institut für Biologie der Humboldt Universität zu Berlin durchgeführt

4.2.3.11 Konstruktion der Plasmide zur Expression von NblA-Fusionsproteinen in *Nostoc 7120*

Die NblA-Fusionsproteine NblA-GFP und NblA(L7A)-GFP wurden von dem selbstreplizierenden Vektor pRL1049 unter der Kontrolle des *nblA*-Promotors und –Terminators in der *nblA*-defizienten Mutante von *Nostoc 7120* exprimiert. Zunächst wurde eine *NdeI*-Restriktionsschnittstelle in den Plasmiden pRL1049#P_{nblA}-nblA₇₁₂₀-T_{nblA} [187] und pRL1049#P_{nblA}nblA₇₁₂₀(L7A)-T_{nblA} [187], generiert (siehe Abschnitt 4.2.3.3). Die erhaltenen Plasmide wurden mit *NdeI* geschnitten (siehe Abschnitt 4.2.3.5), dephosphoryliert (siehe Abschnitt 4.2.3.8) und mit der, ebenfalls *NdeI* geschnittenen, kodierenden DNA-Sequenz von *gfp* ligiert (siehe Abschnitt 4.2.3.9). Die Amplifikation von *gfp* (siehe Abschnitt 4.2.3.2) erfolgte dabei mit den Primern #T7-Promotor und #gfp-pAM, als Template diente dabei der Vektor pAM1819. Die erhaltenen Plasmide pRL1049# P_{nblA}nblA₇₁₂₀(L7A)-gfp-T_{nblA} und pRL1049# P_{nblA}nblA₇₁₂₀-gfp-T_{nblA} wurden in die $\Delta nblA$ *Nostoc 7120*-Mutante konjugiert (Abschnitt 4.2.1.6).

4.2.3.12 Konstruktion von Plasmiden zur Expression in *Synechocystis 6803*

Für die Expression von NblA1- und NblA2-Fluorophor-Fusionsproteinen in der $\Delta nblA1/nblA2$ -Mutante von *Synechocystis 6803* wurde zunächst mithilfe der Primer #nbl11 und #nbl27 unter der Verwendung genomischer DNA aus *Synechocystis 6803* ein DNA-Fragment amplifiziert, welches die kodierende Sequenz von *nblA1* (ORF *ssl0452*) und *nblA2* (*ssl0453*) sowie die angrenzenden Stromaufwärts- bzw. Stromabwärtsbereiche (mit Promotor und Terminatorregion) der Gene enthielt.

Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pET22b ligiert und das erhaltene Plasmid pET#*nblA1*, *nblA2* verwendet um durch gezielte Mutagenese (Abschnitt 4.2.3.3) Restriktionsschnittstellen zu generieren. Dabei wurden am 3'- oder 5'-Ende der kodierenden Region von *nblA1* *NcoI*-Schnittstellen mithilfe der Primer #nblA1QCM1 und #nblA1QCM2 (3'Ende) oder #nblA1QCM3 und #nblA1QCM4 (5'Ende) eingefügt. Das generieren der *NdeI*-Schnittstellen am 3'- oder 5'-Ende der kodierenden Region von *nblA2* erfolgte durch die Primer #nblA2QCM1 und #nblA2QCM2 (3'Ende) oder #nblA2QCM3 und #nblA2QCM4 (5'Ende). Um je eine *NcoI* und *NdeI*-Schnittstelle am 3'-Ende bzw. 5'-Ende von *nblA1* und *nblA2* zu erhalten, wurde die jeweilig andere Schnittstelle in einer zweiten Runde eingefügt. Die resultierenden Plasmide wurden mit *NdeI* oder *NcoI* geschnitten und nach Dephosphorylierung erfolgte die Ligation mit einem DNA-Fragment, das die kodierende Sequenz von *cer* oder *yfp* trug. Das *yfp*-Gen wurde dabei mit den Primern #YFP1 und #YFP2, beide mit einer integrierten *NcoI*-Schnittstelle, mit dem Plasmid pEmYFP als Template amplifiziert, während *cer* mit den Primern #CFP1 und #CFP2 mit integrierter *NdeI*-Schnittstelle mit dem Plasmid pEmCer als Template amplifiziert wurde. Die entstandenen Plasmide (Tabelle 4.8) wurden mit dem jeweils anderen Restriktionsenzym geschnitten, dephosphoryliert und dann mit dem zweiten Fluorophor ligiert, sodass die Plasmide pET22#NblA1_YFP, NblA2_Cer und pET22#YFP_NblA1, Cer_NblA2 entstanden.

Für die Kontrolle, bei der *nblA2* C-terminal an beide Fluorophore fusioniert wurde, wurde in dem Plasmid pet22#NblA1_YFP, NblA2_Cer mithilfe der Primer #nblA1QCM3 und #nblA1QCM4 eine zweite *NcoI*-Schnittstelle generiert (siehe Abschnitt 4.2.3.3). Das resultierende Plasmid wurde mit *NcoI* restrigiert (Partialverdau), dephosphoryliert und mit einem DNA-Fragment, das die kodierende Sequenz von *nblA2* enthielt, ligiert. Das *nblA2*-Fragment wurde dabei mithilfe der Primer #nbl14 und #nbl37 aus genomischer DNA aus *Synechocystis* 6803 amplifiziert. Das erhaltene Plasmid pet22#NblA2_YFP, NblA2_Cer sowie alle anderen in diesem Abschnitt generierten Plasmide wurden mit *XbaI* und *XhoI* geschnitten, so dass man DNA-Fragmente für die Expression der Fluorophor-Fusionsproteine mit angrenzender Promotor- und Terminatorregion erhielt. Diese Fragmente wurden entweder in den pVZ321 oder den pVZ_SpSmr_AK ligiert. Die erhaltenen Plasmide (siehe Tabelle 4.8) wurden im Falle des pVZ321-Vektors in die $\Delta nblA1/nblA2$ *Synechocystis* 6803-Mutante und im Falle des pVZ_SpSmr_AK-Vektors in die $\Delta glgA1/glgA2$ *Synechocystis* 6803-Mutante konjugiert (siehe Abschnitt 4.2.1.6). Zusätzlich wurde das Plasmid pVZ#NblA2_YFP, NblA2_Cer in die $\Delta nblA2$ *Synechocystis* 6803-Mutante konjugiert.

4.2.3.13 Konstruktion von Plasmiden zur Expression in *E. coli*

Konstruktion des Vektors für die Expression von ClpC₇₉₄₂ pGEX#ClpC₇₉₄₂:

Für die Expression des ClpC-Proteins aus *Synechococcus* 7942 (ClpC₇₉₄₂) wurde zunächst das für *clpC* kodierende Fragment (Synpcc7942_0260) mithilfe der Primer #clpC₇₉₄₂_1 und #clpC₇₉₄₂_2, unter Verwendung von genomischer DNA, aus *Synechococcus* 7942 amplifiziert. Das erhaltene PCR-Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym *SmaI* geschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pGEX-BSE ligiert, sodass der Vektor pGEX#ClpC₇₉₄₂ entstand.

Konstruktion des Vektors für die Expression von ClpC₆₈₀₃ ohne Affinitäts-Tag - pET11a#ClpC₆₈₀₃:

Für die Expression von ClpC ohne Affinitäts-Tag wurde zunächst *clpC* (*ssl0020*) mittels PCR, mithilfe der Primer #clpC3 und #clpC5, unter Verwendung von genomischer DNA aus *Synechocystis* 6803 amplifiziert. Das PCR Produkt wurde mithilfe von *NdeI* (Partialverdau) und *BamHI* geschnitten, und in das ebenfalls durch die Restriktionsenzyme geschnittene Plasmid pET11a kloniert, sodass der Vektor pet11a#His-ClpC entstand.

Konstruktion des Vektors für die Expression von ClpC mit N-terminalem His-Tag - pET22b#ClpC₆₈₀₃:

Für die Expression von ClpC₆₈₀₃ mit C-terminalem His-Tag wurde *clpC* mithilfe der Primer #clpC3 und #clpC5 unter Verwendung von genomischer DNA aus *Synechocystis* 6803 amplifiziert und im Anschluss mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* geschnitten. Das restrigierte Fragment wurde dann in den entsprechend geschnittenen Vektor pET22b ligiert, sodass das Plasmid pet22b#ClpC₆₈₀₃ entstand.

Konstruktion des Vektors für die Expression des N-Terminal mit GST-fusionierten Apoproteins von PC -pGEX#cpcA:

Für die Expression der α -Untereinheit von PC, N-Terminal fusioniert mit GST, wurde *cpcA* (*ssl1578*) mithilfe der Primer #cpcA_1 und #cpcA_2, unter Verwendung von genomischer DNA aus *Synechocystis* 6803 amplifiziert. Nach dem Verdau mit *BamHI* und *EcoRI* wurde das PCR-Fragment in das entsprechend geschnittene Plasmid pGEX-2TK ligiert, sodass das Plasmid pGEX#cpcA entstand.

Konstruktion des Vektors pACYC/GST#

Um bei der Expression von zwei Proteinen im Duet-Vektor pACYCDuet-1 auch Proteine mit GST-Tag exprimieren zu können, wurde der Vektor pACYC/GST konstruiert. Dazu wurde das Plasmid pGEX-2TK/*NdeI* [Karradt *et al.*, 2008] mit *NdeI* und *SmaI* geschnitten und das erhaltene für *gst* kodierende DNA-Fragment in den zuvor mit *NdeI* und *EcoRV* geschnittenen Expressionsvektor pACYCDuet-1 ligiert.

Konstruktion der Vektoren für die Expression NblA1-GST und NblA2-GST:

Für die Expression von NblA1 und NblA2 mit C-terminalem GST-Tag wurden die Gene *nblA1* (*ssl0452*) und *nblA2* (*ssl0453*), unter Verwendung von genomischer DNA aus *Synechocystis* 6803, mit den Primern #nbl17 und #nbl28 für *nblA1* und #nbl24 und #nbl31 für *nblA2* amplifiziert. Dabei beinhaltete jede Primersequenz eine *NdeI*-Schnittstelle, sowie Primer #nbl28 und #nbl31 zusätzlich

den kodierenden Bereich der Erkennungssequenz der PreScission®-Protease. Nach der Restriktion der PCR-Fragmente mit *NdeI*, wurden diese in den ebenfalls mit *NdeI* geschnittenen und dephosphorylierten Expressionsvektor pACYC/GST ligiert. Dabei entstanden die Plasmide pACYC#NblA1-GST und pACYC#NblA2-GST.

Konstruktion der Vektoren für die Koexpression von NblA1 und NblA2:

- Für die Koexpression von His-NblA1 und NblA2-GST wurde das *nblA1*-Gen mit den Primern #nbl32 und #nblA-4, unter Verwendung von genomischer DNA amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Fragment wurde mit *EcoRI* und *HindIII* geschnitten und in die entsprechend geschnittene erste *multiple cloning site* (MCSI) des pACYC#NblA1 Vektors ligiert. Das so generierte Plasmid pACYC#His-nblA1, nblA2-GST wurde durch Sequenzierung auf seine Richtigkeit überprüft.
- Für die Koexpression von His-NblA2 und NblA1-GST wurde das *nblA2*-Gen mit den Primern #nbl33 und #nbl34 unter Verwendung von genomischer DNA amplifiziert. Das erhaltene DNA-Fragment wurde mithilfe der Restriktionsenzyme *HindIII* und *EcoRI* geschnitten und in den ebenfalls entsprechend geschnittenen Vektor pACYC#nblA1-GST ligiert, sodass das Plasmid pACYC#His-nblA2, nblA1-GST entstand.
- Für die Koexpression von NblA2 und NblA1-GST wurde das *nblA2*-Gen mit den Primern #nbl14 und #nbl21 unter Verwendung von genomischer DNA aus *Synechocystis* 6803 amplifiziert. Das daraus resultierende PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *EcoRI* geschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pACYC#NblA1-GST ligiert. Dabei entstand das Plasmid pACYC#NblA2, NblA1-GST.
- Für die Koexpression von His-NblA1 NblA2-GFP wurde *nblA2* unter Verwendung von genomischer DNA aus *Synechocystis* 6803 mit den Primern #nbl24 und #nbl36 amplifiziert. Die Amplifikation von *gfp* erfolgte mit den Primern #gfp_3 und #gfp_4 unter Verwendung des Vektors pAM1819 als Template. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit *NdeI* und *BglII* (*nblA2*) bzw. *BglII* und *XhoI* (*gfp*) geschnitten und in die mit *NdeI* und *XhoI* geschnittene MCII des pCOLA-Duet ligiert. In den erhaltene Vektor pCOLA#nblA2-gfp wurde wie oben beschrieben *nblA1* ligiert, sodass der Vektor pCOLA#His-NblA1, NblA2-GFP entstand.

Konstruktion des Vektors für die Koexpression der proteolytischen Untereinheiten pACYC#ClpP1-His, ClpR

Für die Koexpression von His-ClpP1 und ClpR wurde zunächst die kodierende Sequenz des *clpP1*-Gens (*slr0542*) unter der Verwendung der Primer #clpP1_1 und #clpP1_2 mit genomischer DNA aus *Synechocystis* 6803 als Template amplifiziert. Das erhaltene PCR-Fragment wurde durch das Restriktionsenzym *NcoI* geschnitten und in die entsprechend geschnittene MCI des pACYC-Duet

Vektors kloniert (pACYC#ClpP1). Im Anschluss wurde *clpR* (*slr0164*) mit den Primern *clpR_1* und *clpR_2* amplifiziert und das PCR-Produkt durch *NdeI* und *XhoI* geschnitten. Das erhaltene Fragment wurde in die MCII des Vektors pACYC#clpP1 kloniert, sodass der Vektor pACYC#ClpP1-His, ClpR daraus entstand.

Alle generierten Konstrukte wurden durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

4.2.4 Biochemische Methoden

4.2.4.1 Native Gelelektrophorese

Die native Gelelektrophorese erfolgte mit einem Gradientengel von 4-16 % von Serva (ServaGelTMN 4-16 verticalen Nativgele), nach Angaben des Herstellers.

4.2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde das kontinuierliche Tris-Tricin-Puffersystem nach Schägger [277] sowie das diskontinuierliche Lämmli-System [278] mit Tris-Glycin-Puffern unter Verwendung von Tricin-SDS-Gelen verwendet.

Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (1 min, 14000 rpm, Eppendorf Tischzentrifuge). Anschließend wurden die Proben sowie parallel, für das Abschätzen der apparenten Molekülmasse, ein Mix aus Referenzproteinen (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, MBI Fermentas) auf das SDS-Gel aufgetragen. Je nach Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine wurde entweder ein Gel mit Stufengradient mit 5 % Sammelgel, 10,6 % Spacergel und 18 % Trenngel nach Schägger und van Jagow oder ein 12 % bzw. 15 % Polyacrylamidgel nach Lämmli gewählt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte durch das Anlegen einer Spannung von 20 mA pro Gel.

Im Anschluss wurden die Gele 5 min in Fixierlösung durch schwenken fixiert, 30 min in Coomassie-Färbelösung auf einem Flachbettschüttler geschwenkt und im Anschluss durch Fixierlösung entfärbt. Die Aufbewahrung der Gele erfolgte in 7 % Essigsäure bei 4 °C. Für die Dokumentation wurden die gefärbten Proteine mithilfe eines Durchlichtscanners (Canon) digitalisiert.

Alternativ wurden die Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (siehe Abschnitt 4.2.4.3).

4x Probenpuffer:	250 mM Tris/HCl, 40 % (w/v) Glycin, 8 % (w/v) SDS, 0,4 M DTT, 0,4 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
Coomassie-Färbelösung:	0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva); 40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure
Fixier-Lösung:	50 % (v/v) Ethanol (vergällt); 10 % (v/v) Essigsäure

System nach Lämmli:

Trenngel-Puffer:	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Sammelgel-Puffer:	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
Acrylamid/Bis-Acrylamid-Stammlösung:	40 % AA/BIS (29:1)
Laufpuffer (1 x):	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1 % (w/v) SDS

Komponente	12 % Trenngel	15 % Trenngel	5 % Sammelgel
40 % AA/BIS-Stammlösung	3,0 ml	3,75 ml	0,625 ml
Trenngel-Puffer	2,5 ml	2,5 ml	-
Sammelgel-Puffer	-	-	2,5 ml
A. bidest	4,3 ml	3,5 ml	1,77 ml
10 % (w/v) SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,05 ml
TEMED	10 µl	10 µl	5 µl
10% (w/v) APS	100 µl	100 µl	50 µl

System nach Schägger und von Jago

Probenpuffer (5 x):	62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8, 10 % (w/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 5 % (w/v) β-Mercaptoethanol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
Gelpuffer:	3 M Tris, pH 8,45, 0,3 % SDS
1x Kathodenpuffer:	0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS, pH 8,25
1x Anodenpuffer:	0,1 M Tris, pH 8,9

Acrylamid-Mix:	49,5 % Acrylamid, 3 % Bisacrylamid
----------------	------------------------------------

Komponente	Trenngel	Spacergel	Sammelgel
Acrylamid-Mix	3,0 ml	1,02 ml	0,7 ml
Gelpuffer	3,5 ml	1,67 ml	1,55 ml
Harnstoff	3,6 g	-	-
A. bidest	2,0 ml	2,32 ml	4,0 ml
APS	66 µl	34 µl	50 µl
TEMED	7 µl	3,6 µl	5 µl

4.2.4.3 Immunoblotanalyse

Bei einer Immunoblotanalyse werden Proteine, die durch eine SDS-PAGE (Abschnitt 4.2.4.1) entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden, auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert und durch einen Antikörper markiert. Dies erfolgte durch Elektrotransfer nach Kyhse-Andersen [279] mit einer *Semi-Dry-Blot*-Einheit (*Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell*,

Biorad). Dazu wurde das SDS–Polyacrylamidgel nach der Auftrennung der Proteine kurz in Wasser gespült und 5 Minuten in Kathodenpuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Semi–Dry–Blot–Apparatur nach Angaben des Herstellers zusammengebaut. Der Transfer der Proteine erfolgte durch eine konstante Stromstärke von 2 mA pro cm² Gel für 60 Minuten.

Nach dem Transfer wurden mithilfe einer Ponceau–Rot Färbung die auf der Membran immobilisierten Proteine angefärbt. Die freien Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran wurden durch einstündige Inkubation mit 5 % Magermilchpulver in TBST abgesättigt. Nach dem Waschen der Membran mit TBST (2 x 5 min und 2 x 15 min) wurde die Membran mit dem primären Antikörper inkubiert (je nach Affinität von 1,5 h bis ü. N.). Nach Entfernen von überschüssigem Antikörper durch Waschen mit TBST (2 x 5 min und 2 x 15 min) wurde die Membran mit dem Peroxidase (POD)–konjugierten sekundären Antikörper (1:40.000 verdünnt in TBST) für 45 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST erfolgte die Entwicklung mit dem Immobilon™ Western Kit von Millipore nach den Angaben des Herstellers. Die Sichtbarmachung erfolgte mithilfe des Molekularimagers Geldoc von Biorad bzw. durch Röntgenfilme.

Anodenpuffer:	10 % (v/v)	Roti®-BlotA (10 x-konz Anodenpuffer (Roth)), 20 % (v/v) Ethanol
Kathodenpuffer:	10 % (v/v)	Roti®-BlotK (10 x-konz. Kathodenpuffer (Roth)), 20 % (v/v) Ethanol
Ponceau:	2 % (w/v)	Ponceau S, 30 % (v/v) TCA, 30 % (v/v) Sulfosalicylsäure, 1:100 mit A. bidest verdünnt
TBST:		100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20

4.2.4.4 Bestimmung der Chl *a*-Konzentration

Die Bestimmung des Chl *a*-Gehaltes erfolgte nach der Methode von Tandeau de Marsac und Houmard [280]. Dafür wurden 1 ml *Nostoc* 7120 bzw. *Synechocystis* 6803 Kultur bei 8.000 rpm für 5 Minuten (Eppendorf–Tischzentrifuge) und bei RT zentrifugiert. 900 µl des Überstandes wurden abgenommen und durch das gleiche Volumen an Methanol ersetzt. Die sedimentierten Zellen wurden resuspendiert. Bei *Nostoc* 7120 wurden die nicht lysierten Zellfäden im Ultraschallbad aufgeschlossen. Anschließend wurde der Ansatz für weitere 5 Minuten zentrifugiert (14.000 rpm, Eppendorf–Tischzentrifuge, RT) und der erhaltene Überstand bei 665 nm photometrisch gegen 90 % Methanol als Leerwert vermessen. Der Chlorophyllgehalt wurde im Anschluss nach dem Lambert–Beerschen-Gesetz anhand des Extinktionskoeffizienten errechnet:

$$\text{Chl } a \text{ } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{665 \text{ nm}} \times 13,9$$

Formel 4.3

Neben ganzen Zellen wurde auch schon aufgeschlossener Gesamtzellextrakt (Abschnitt 4.2.4.8) für die Chl *a*-Bestimmung verwendet. Dafür wurden 5 µl des Gesamtzellextraktes mit 95 µl Puffer verdünnt und anschließend mit 900 µl Methanol versetzt. Nach der anschließenden Zentrifugation (14.000 rpm, Eppendorf–Tischzentrifuge, RT) erfolgte die Vermessung der Proben wie beschrieben.

4.2.4.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford [281] .

4.2.4.6 DOC/TCA-Fällung von Proteinen

In Lösungen enthaltene Proteine wurden mittels DOC/TCA-Fällung konzentriert [282] . Dazu wurden proteinhaltige Lösungen mit A. bidest auf 1 ml aufgefüllt und mit 25 µl 2 % DOC-Lösung versetzt. Nach gründlicher Durchmischung und 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden 30 µl einer 40 % TCA-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und im Anschluss zentrifugiert (10 min, 14.000 rpm, Eppendorf–Tischzentrifuge, RT). Der erhaltene Überstand wurde verworfen und das Pellet in drei Volumenteilen ChuaA sowie zwei Volumenteilen ChuaB aufgenommen und durch fünfminütige Inkubation bei 95 °C und anschließender Zentrifugation (1 min, 14.000 rpm, Eppendorf–Tischzentrifuge, RT). für die SDS-PAGE vorbereitet.

DOC:	2 % (w/v) DOC
TCA:	40 % (w/v) TCA
ChuaA:	0,1 M Na ₂ CO ₃ , 0,1 M DTT,
ChuaB:	5 % (w/v) SDS, 30 % (w/v) Saccharose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

4.2.4.7 Heterologe Expression von Proteinen in *E. coli*

Zur heterologen Expression von Proteinen wurden *E. coli* BL21-Zellen verwendet, welche ein Expressionsplasmid trugen, in das die cDNA des jeweiligen zu exprimierenden Gens ligiert wurde (siehe Abschnitt 4.2.3.13).

Für die Anzucht der Zellen wurden 300-600 ml LB-Medium oder TB(*terrific broth*)-Medium mit entsprechenden Antibiotika 1:100 mit einer ü. N. gewachsenen Kultur angeimpft und in einem Schüttelinkubator bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5–0,6 angezogen. Die heterologe Expression des gewünschten Proteins wurde durch 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Abhängig von den optimalen Expressionsbedingungen des Proteins wurden die Zellen 3 Stunden bei 30 °C oder ü. N. bei 18 °C und 250 rpm inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen sedimentiert (10 min, 5.000 rpm, Sorvall, Rotor SLA 1000, 4 °C) und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

TB-Medium: Roth , 4 ml Glycerin

4.2.4.8 Herstellung von Zellextrakten

E. coli:

Die *E. coli*-Zellpellets wurden in 4 ml Puffer pro g Zellen (Feuchtgewicht) des gewünschten Puffers aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung mit einem Homogenisator (Sonopuls) (2x 2 min, Puls 2 bei 55 % Leistung) bei 4 °C. Anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile des Lysats durch Zentrifugation (30 min, 14.000 rpm, Sorvall, Rotor SS34, 4 °C) von den löslichen Bestandteilen getrennt.

Synechocystis 6803 und Nostoc 7120:

Die Cyanobakterienzellen wurden in ein entsprechendes Volumen Na/K-Phosphatpuffer aufgenommen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels Glasperlen. Dazu wurde der Ansatz mit 0,75 Volumen Glasperlen (v/v) gemischt und bei 4 °C für zweimal 10 min in der Schwingmühle (Retsch) geschüttelt. Nicht aufgeschlossene Zellen und Glasperlen wurden im Anschluss durch Zentrifugation (5 min, 3000 rpm, Hettich, Tischzentrifuge, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand (Gesamtzellextrakt) wurde für die Chl *a* Bestimmung eingesetzt. In einem weiteren Zentrifugationsschritt (30 min, 14000 rpm, Hettich, Tischzentrifuge, 4 °C) wurden die unlöslichen von den löslichen Zellbestandteilen getrennt.

Na/K-P-Puffer: 20 mM K/Na-P-Puffer, pH 7,6 (nach Sörensen), 200 mM KCl,
 20 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 % (v/v) Glycerol

4.2.4.9 Reinigung von NblA aus *Nostoc 7120* und NblA2 aus *Synechocystis 6803* mittels Ammoniumsulfatfällung und Größenausschlusschromatografie

Zur Reinigung von NblA aus *Nostoc 7120* und NblA2 aus *Synechocystis 6803* ohne Affinitäts-Tag wurden die Proteine in den entsprechenden *E. coli*-Stämmen exprimiert. Die Kulturen wurden in LB-Medium mit Ampicillin unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 angezogen. Die Proteinexpression erfolgte nach Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM) ü. N. bei 18 °C. Der lösliche Rohextrakt wurde aus 300 ml Kultur, wie unter Abschnitt 4.2.4.7 und 4.2.4.8 beschrieben, hergestellt. Als erster Reinigungsschritt erfolgte eine Ammoniumsulfatfällung. Dafür wurde der Rohextrakt mit dem Na-Phosphatpuffer auf 25 ml aufgefüllt. Unter ständigem Rühren bei RT wurde schrittweise Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 30 % zugegeben, um NblA auszufällen. Gefällte Proteine wurden anschließend durch 10-minütige Zentrifugation bei RT (14.000 rpm, Sorvall, Rotor SLA 100) sedimentiert. Das Proteinpellet wurde in 2 ml Puffer resuspendiert und ein weiteres Mal zentrifugiert (14.000 rpm, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge). Um eine möglichst homogene Proteinlösung zu erhalten, folgte im Anschluss eine präperative Größenausschlusschromatografie. Dazu wurden die 2 ml NblA enthaltende Proteinlösung auf die mit

demselben Puffer äquilibrierte Säule Tricorn Superdex 75 10/300 GL der ÄktaPurifier (GE Healthcare) aufgetragen. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min und die eluierten Proteine wurden in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Elution der Proteine wurde bei einer Wellenlänge von 220 nm verfolgt. Anhand der ermittelten Elutionszeit von Markerproteinen mit bekanntem Molekulargewicht, die unter den gleichen Bedingungen über die Säule aufgetrennt wurden, konnten Fraktionen ausgewählt werden, die NblA bzw. NblA2 enthielten. Die Reinheit der ausgewählten Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Anschließend wurden die Fraktionen vereinigt und NblA bzw. NblA2 mithilfe eines Zentrifugalkonzentrators (Vivaspin 500, 5 kDa Ausschlussgewicht) konzentriert. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (siehe Punkt 2.2.3.10) bestimmt.

Na/K-Phosphatpuffer: 20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7.6)

4.2.4.10 *Reinigung von GST-Fusionsproteinen mittels Glutathion-Agarose*

Die Reinigung von GST-Fusionsproteinen erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, im *batch*-Verfahren mit Glutathion-Agarose 4B (Macherey-Nagel). Zunächst wurde die Affinitätsmatrix dreimal mit dem fünffachen Volumen an Puffer gewaschen und zur Bindung des GST-Fusionsproteins in einem Volumen-Verhältnis von 1:100 (Matrix:Extrakt) zu dem löslichen Zellextrakt gegeben, und eine Stunde bei RT unter ständigem Invertieren bei 5 rpm in einem Rotator (Intelli Mixer RM-2M) inkubiert. Um die Glutathion-Agarose mit dem gebundenen GST-Fusionsprotein zu sedimentieren, wurde der Ansatz im Anschluss 5 Minuten bei 2.500 rpm zentrifugiert (Beckmann-Zentrifuge, Rotor S1480, RT). Nicht gebundene Proteine wurden durch drei bis viermaliges Waschen (dreifaches Matrixvolumen an Puffer) der Matrix entfernt.

Die Elution des GST-Fusionsproteins erfolgte entweder durch Glutathion oder durch die Abtrennung des GST-Tags. Bei der Elution durch Glutathion wurde die Matrix durch Zugabe von glutathionhaltigem Elutionspuffer (einfaches Volumen der Matrix) äquilibriert und anschließend sedimentiert (3 min, 2.500 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge, RT). Der erhaltene Überstand (Eluat) wurde in ein neues Gefäß überführt und bei 4 °C aufbewahrt. Die noch an die Matrix gebundenen Proteine wurden durch drei weitere Elutionsschritte mit glutathionhaltigem Elutionspuffer (0,8-faches Volumen der Matrix) bei 20 minütigem Schwenken eluiert und nach Sedimentieren der Matrix (3 min, 2.500 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge, RT) mit den Eluaten der anderen Elutionsschritte vereinigt. Im Anschluss wurden die Proteine durch Zugabe von dreimal 1 ml des gewünschten Puffers mit anschließender Zentrifugation (10 min, 4.000 rpm, Beckmann-Zentrifuge, 4 °C) in einem Zentrifugalkonzentrator umgepuffert und konzentriert. Dabei wurde das Ausschlussgewicht des Zentrifugalkonzentrators so gewählt, dass es ungefähr dem halben Molekulargewicht des zu konzentrierenden Proteins entsprach.

Die Elution durch Abtrennung des Affinitäts-Tags erfolgte durch Zugabe von 200 U der PreScission®-Protease mit anschließender Inkubation bei 4 °C ü. N. unter ständigem invertieren. Nach der Inkubation wurde die Matrix sedimentiert (1 min, 5.000 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge, RT) und im Überstand enthaltene eluierte Proteine abgenommen. Um noch im Ansatz verbliebene Proteine zu eluieren, wurde die Matrix mit 200 µl Puffer gewaschen. Die Konzentrierung der Proteine erfolgte mittels Zentrifugalkonzentrator.

glutathionhaltiger Elutionspuffer:	40mM	reduziertes Glutathion
	50 mM	Tris/HCL pH 8,0

4.2.4.11 *Reinigung von His-Fusionsproteinen mittels Ni-IDA-Resins*

Die Reinigung von His-Fusionsproteinen erfolgte mit Protino® Ni-IDA-Resins (Macherey und Nagel). Zur Bindung des His-Fusionsproteins wurde eine Spatelspitze der Resins direkt zu dem löslichen Zellextrakt gegeben und eine Stunde bei 5 rpm und Raumtemperatur invertiert. Im Anschluss setzte sich die Matrix durch 5-minütiges stehen bei RT ab (es war keine Zentrifugation erforderlich). Nicht gebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit 1 ml Puffer entfernt. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 200 µl 250 mM Imidazol im verwendeten Puffer und fünf Minuten Inkubation bei RT. Die im Überstand befindlichen, eluierten Proteine wurden in ein neues Gefäß überführt und bei 4 °C gelagert. Noch an die Matrix gebundene Proteine wurden durch zwei weitere Elutionsschritte eluiert. Um im Puffer vorhandenes Imidazol zu entfernen, wurden die Proteine durch Zugabe von dreimal 1 ml des gewünschten Puffers mit anschließender Zentrifugation (10 min, 4.000 rpm, Beckmann-Zentrifuge, 4 °C) in einem Zentrifugalkonzentrator umgepuffert und konzentriert.

4.2.4.12 *Größenausschlusschromatografie*

Der Oligomerisierungszustand der rekombinanten Proteine wurde mithilfe einer Größenausschlusschromatographie analysiert. Dabei kam eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie(HPLC)-Anlage zum Einsatz (Äkta Purifier, GE Healthcare). Eine entsprechende Menge des gereinigten Proteins wurden in Na/K-Phosphatpuffer bzw. TRIS-Puffer-A mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf eine mit Puffer äquilibrierte Superdex 75 10/300 GL-Säule (GE Healthcare) bzw. Superdex™ 200 10/300 GL-Säule aufgetragen und die Elution der Proteine bei konstanter Flussrate anhand einer Absorptionsmessung bei 220 nm und 280 nm verfolgt. Zur weiterführenden Analyse wurden Proteinproben in Fraktionen von je 0,5 ml gesammelt, durch DOC/TCA-Fällung (4.2.4.6) konzentriert und entsprechend für die SDS-PAGE (Abschnitt 4.2.4.1) vorbereitet. Nach jedem Lauf wurde der *Gel Filtration* Standard (Biorad) unter den gleichen Bedingungen aufgetrennt.

Tris-Puffer-A: 50 mM Tris (pH 7,5), 75 mM KCl

4.2.4.13 *In vitro-pulldown-Analysen*

Interaktion von NblA-GST aus *Nostoc* 7120 mit homologen ClpC-Proteinen:

Die Expression und Reinigung von NblA₇₁₂₀-GST erfolgte wie von Karradt *et al.* [187] beschrieben. Das GST-ClpC₇₁₂₀-Fusionsproteins sowie GST-ClpC₇₉₄₂ und His-ClpC₆₈₀₃ wurden nach Zugabe von 1 mM IPTG für 3 Stunden bei 30 °C in *E. coli* heterolog exprimiert. Die Reinigung verlief dann wie unter 4.2.4.10 bzw. 4.2.4.11 beschrieben.

Für die *in vitro-pulldown*-Versuche wurde NblA₇₁₂₀ mit ClpC₇₁₂₀ oder ClpC₇₉₄₂ bzw. His-ClpC₆₈₀₃ in äquimolaren Konzentration (jedes Protein 5 µM), in Na/K-Phosphatpuffer für 15 Minuten bei RT, mit oder ohne Zugabe von 5 mM ATP, inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Glutathion-Agarose gefolgt von 30-minütigem Schwenken bei 5 rpm in einem Rotator (Intelli Mixer RM-2M). Die Zellen wurden sedimentiert (3 min, 2.500 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge, RT), 3-malig mit 500 µl Na/K-Phosphatpuffer, der bei den Proben mit ATP zusätzlich 0,5 mM ATP enthielt, gewaschen und durch Zugabe von glutathionhaltigem Elutionspuffer eluiert. Die eluierten Proteine wurden durch eine DOC/TCA-Fällung (siehe Abschnitt 4.2.4.6) konzentriert und mittels einer SDS-PAGE (siehe Abschnitt 4.2.4.2) mit 6 M Harnstoff analysiert.

Interaktion von NblA1 und NblA2:

Die Koexpression der Fusionsproteine His-NblA1/NblA2-GST bzw. His-NblA2/NblA1-GST erfolgte durch IPTG bei 18 °C über Nacht. Nach der Sedimentation der Zellen wurde das Zellpellet in Tris-Puffer B aufgenommen und löslicher Zellextrakt gewonnen (Abschnitt 4.2.4.8). Um die Koreinigung der Proteine zu untersuchen, wurde der lösliche Zellextrakt geteilt und eine Hälfte mit Glutathion-Agarose und die andere Hälfte mit Ni-IDA-Resins inkubiert. Die Fusionsproteine wurden dann wie in den Abschnitten 4.2.4.10 und 4.2.4.11 beschrieben gereinigt und mittels glutathionhaltigem- bzw. imidazolhaltigem Elutionspuffer eluiert. Die Analyse der eluierten Proteine erfolgte gleich im Anschluss durch eine SDS-PAGE mit 6 M Harnstoff.

Interaktion des NblA1, NblA2 und NblA1/NblA2 mit GST-CpcA, PBP und ClpC:

Die Expression von GST-CpcA erfolgte nach der Induktion mit 1 mM IPTG für 3 Stunden bei 30 °C, wohingegen NblA1-GST nach der IPTG-Zugabe 80 Stunden bei 18 °C inkubiert wurde. Die Expression des NblA2-GST-Fusionsproteins, bzw. die Koexpression von His-NblA2/NblA1-GST und His-NblA2/NblA1-GST, erfolgte wiederum nach IPTG-Zugabe bei 18 °C ü. N. Für die Untersuchung der Interaktion mit ClpC erfolgte die Expression vom pET11a durch Zugabe von IPTG für drei Stunden bei 30 °C. Nach der Sedimentation der Zellen wurden alle Zellpellets in TRIS-Puffer A aufgenommen. Der

Aufschluss der Zellen und die Reinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte wie im Abschnitt 4.2.4.8 und 4.2.4.10 beschrieben.

- Um die Interaktion von GST-CpcA mit NblA1, NblA2 und ClpC zu untersuchen, wurde Glutathion-Agarose zu löslichem Zellextrakt, der GST-CpcA-Fusionsprotein enthielt, gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation durch Invertieren auf einem Rotator, wurden nicht gebundene Proteine durch 3-maliges waschen mit 1 ml TRIS-Puffer C entfernt und die mit GST-PC beladene Glutathion-Agarose in gleichgroße Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden mit ClpC-enthaltendem Rohextrakt in Anwesenheit von 5 mM ATP und (1) NblA1, (2) NblA2, (3) NblA1 und His-NblA2 oder (4) ohne NblA inkubiert, wobei alle NblA-Proteine im Überschuss zugegeben wurden. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei RT unter sanftem schwenken auf einem Rotator wurden nicht gebundene Proteine durch 3-maliges waschen mit 500 µl Tris-Puffer C entfernt. Der verwendete Tris-Puffer C enthielt dabei 0,5 mM ATP. Spezifisch an die Matrix gebundene Proteine wurden im Anschluss, wie oben beschrieben, mit glutathionhaltigem Elutionspuffer eluiert und durch eine SDS-PAGE mit 6 M Harnstoff (siehe Abschnitt 4.2.4.2) analysiert.
- Um die Interaktion von NblA1-GST bzw. NblA2-GST mit ClpC und den PBP zu untersuchen, wurden NblA1-GST bzw. NblA2-GST an Glutathion-Agarose immobilisiert und die mit dem Fusionsprotein beladenen Matrix mit 5 mM ATP, ClpC enthaltendem Rohextrakt sowie, im Falle von NblA1-GST mit NblA2 und im Falle von NblA2-GST, mit NblA1 inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden, wie oben beschrieben, mit TRIS-Puffer C entfernt, spezifisch an die Matrix gebundene Proteine eluiert und analysiert.
- Für die *in vitro*-Interaktionsanalysen von PBP mit ClpC und NblA1/NblA2 wurden Ni-Ida-Resins mit NblA1/His-NblA2 beladen, in drei Aliquots aufgeteilt und mit ClpC enthaltenem löslichen Zellextrakt inkubiert. Zusätzlich wurde (1) ATP, (2) löslicher Zellextrakt von *Synechocystis* 6803 oder (3) löslicher Zellextrakt von *Synechocystis* 6803 und ATP zugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation durch sanftes schwenken auf einem Rotator wurden nicht gebundene Proteine durch waschen mit TRIS-Puffer C und 0,5 mM ATP, für die ATP enthaltenden Ansätze, bzw. TRIS-Puffer C für den Ansatz ohne ATP, entfernt. Spezifisch an die Matrix gebundene Proteine wurden mit imidazolhaltigem Elutionspuffer eluiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

Tris-Puffer B 50 mM TRIS (HCL (pH 7.5)), 75 mM KCl, 1mM DTT

Tris-Puffer C 50 mM TRIS (HCL (pH 7.5)), 75 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1mM DTT

4.2.4.14 *Isolierung von PBS aus Gesamtzellextrakt von Synechocystis 6803*

Die Isolierung von intakten PBS aus *Synechocystis* 6803 erfolgte nach Ducret *et. al.* [92] mittels Saccharosestufengradienten in modifiziertem Isolationspuffer.

Isolationspuffer: 0,9 M KH_2PO_4 (pH 7,0), 2 mM EDTA, 1mM NaN_2 , 1 % Triton

4.2.4.15 *Proteolytischer Abbau von Proteinen in vitro*

Die Koexpression der proteolytischen Untereinheiten ClpP1-His und ClpR sowie der proteolytischen Untereinheit His-ClpP1, erfolgte nach Zugabe von IPTG ü. N. bei 18 °C. Im Anschluss wurden die Zellen sedimentiert und in Tris-Puffer A aufgenommen. Die Reinigung erfolgte mittels Ni-Ida Resins über den His-Tag von ClpP1 und die Elution durch imidazolhaltigen Elutionspuffer (Abschnitt 4.2.4.11). Die Expression von NblA2/NblA1-GST und His-NblA1/NblA2-GFP erfolgte bei 18 °C ü. N. Die Reinigung und Elution von NblA2/NblA1-GST dann durch Glutathion-Agarose mit anschließendem PreScission®-Protease, wie unter Abschnitt 4.2.4.10 beschrieben. Die Reinigung von His-NblA1/NblA2-GFP hingegen erfolgte über Ni-Ida-Resins wie unter Abschnitt 4.2.4.11 beschrieben.

Detektion des proteolytischen Abbaus durch eine SDS-PAGE

In vitro-Verdau von α -Casein: Für die Degradation von α -Casein durch die rekombinante Clp-Protease wurden alle Proteine in äquimolaren Mengen (Endkonzentration 2 μM) eingesetzt. Zusätzlich zu α -Casein, His-ClpC₆₈₀₃ und His-ClpP1/ClpR wurde ein ATP-Regenerationssystem verwendet. In 75 μl Tris-Puffer C (Endvolumen) wurden dazu α -Casein sowie das ATP-Regenerationssystem eingesetzt. Zusätzlich enthielten die Ansätze (1) His-ClpC₆₈₀₃ und His-ClpP1/ClpR, (2) His-ClpC₆₈₀₃, (3) His-ClpP1/ClpR oder (4) His-ClpP1 und His-ClpC₆₈₀₃. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 mM ATP gestartet und die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Direkt nach der Zugabe von ATP (0), sowie zu den Zeitpunkten 2, 5, 7 und 10 Minuten wurden je 10 μl Probe entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 2 x-SDS-Probenpuffer gestoppt. Die Analyse der Proben erfolgte durch eine SDS-PAGE mit 6 M Harnstoff (siehe Abschnitt 4.2.4.2).

In vitro-Verdau von NblA1/NblA2: Die Degradation von NblA1/NblA2 erfolgte wie für den Abbau von α -Casein beschrieben. Nur das anstatt α -Casein 2 μM NblA1/NblA2 eingesetzt wurden und die Probenentnahme direkt nach der Zugabe von ATP (0) sowie zu den Zeitpunkten 10, 20 und 30 Minuten erfolgte.

In vitro-Verdau von NblA1/NblA2 und den PBS: Der Versuch erfolgte wie oben beschrieben. In TRIS-Puffer C mit einem Endvolumen von 100 μl wurden neben NblA1/NblA2, dem Regenerationssystem und 2 mM ATP (1) NblA1/NblA2, (2) NblA1/NblA2 und ClpC oder (3) NblA1/NblA2, ClpC und 26 μg aus *Synechocystis* 6803 isolierte PBS eingesetzt. Direkt nach der Zugabe von ATP, sowie nach 30 Minuten,

wurden jeweils 25 µl Probe entnommen und die Reaktion durch 5x SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE mit 6 M Harnstoff.

ATP-Regenerationssystem: Pyruvat Kinase (Roche), 4 mM PEP

Detektion des proteolytischen Abbaus durch Fluoreszenzabnahme

Abbau von His-NbIA1/NbIA2-GFP: Die Degradation von His-NbIA1/NbIA2-GFP erfolgte ebenfalls ähnlich wie oben beschrieben. 2 µM gereinigtes His-NbIA1/NbIA2-GFP-Protein wurde mit äquimolaren Mengen (1) His-ClpC₆₈₀₃ und ClpP1-His/ClpR bzw. (2) ClpP1-His/ClpR in TRIS-Puffer C mit einem Endvolumen von 20 µl und in Anwesenheit des ATP-Regenerationssystems bei 37 °C inkubiert. Nach dem Start der Reaktion sowie nach 30-minütiger Inkubation wurden je 5 µl des Ansatzes entnommen, mit 3 ml TRIS-Puffer C versetzt und die GFP-Fluoreszenz in einem Fluoreszenzspektrometer vermessen (siehe Abschnitt 4.2.2.2).

Abbau der PBS: Der Versuch erfolgte genau wie oben beschrieben, nur wurden zu den angegebenen Zeitpunkten 45 µl Probe entnommen, mit 2 ml TRIS-Puffer C versetzt und die PBS-Fluoreszenz in einem Fluoreszenzspektrometer vermessen (siehe Abschnitt 4.2.2.2).

4.2.4.16 Aufnahme von CD-Spektren

Die jeweiligen NbIA-Proteine wurden in Na-Phosphatpuffer exakt auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml eingestellt. Die Messungen erfolgten in einem Jasco-715 Spektropolarimeter (Jasco Labor- und Datentechnik, Gross Umstadt). Die Untersuchungen im fernen UV (190-240 nm) erfolgten in Quarz-Küvetten mit einer Schichtdicke von 0,1 cm bei 20 °C. Die Spektren wurden jeweils dreifach akkumuliert. Aus der Elliptizität, gemessen in [mdeg], wurde die konzentrations- und schichtdickenunabhängige molare Elliptizität in [deg*cm²/dmol] berechnet.

$$\text{Molare Elliptizität } \Theta \text{ [deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}] = \frac{\text{Elliptizität [mdeg]} \cdot \text{mittlere molare Masse } \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]}{\text{Schichtdicke [cm]} \cdot \text{Konzentration } \left[\frac{\text{g}}{\text{l}}\right]} \quad \text{Formel 4.4}$$

Dabei wurde die mittlere molare Masse - MRW (*mean residue weight*) ermittelt, indem die Summe der Molmassen aller Aminosäurereste des NbIA-Proteins durch die Anzahl der Aminosäuren dividiert wurde.

Die Sekundärstruktur wurde mithilfe des Programms DichroWeb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) mit den algorithmischen Programmen CDSSTR, SELCON und CONTIN ausgewertet. Erhaltene Datensätze mit einem im Rahmen liegenden NRMSD-Wert wurden gemittelt und die errechneten Sekundärstrukturelemente in Prozent angegeben (näheres siehe Abschnitt 2.4.1.1).

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff
° C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
A	Amper
AAA	<i>ATPases associated with a variety of cellular activities</i>
Amp	Ampicilin
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
A.-biDest	zweifach destilliertes Wasser
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCM	CO ₂ -Konzentrierungsmechanismus
Cer	Cerulean
Chl	Chlorophyll
Clp	<i>caseino-lytic proteases</i>
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOC	Deoxycholat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escheria coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und andere)
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
FtsH	<i>filamentation temperature-sensitive</i>

g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
GPS	<i>Group-based prediction system</i>
h	Std
HetR	<i>heterocyst differentiation control protein</i>
HslUV	<i>heat shock locus genes U and V</i>
His	Histidin
H ₂ O	Wasser
HL	Starklicht
HLR1	<i>multiple high-light regulatory sequence 1</i> (multiple Starklichtregulationssequenz 1)
Hsp	Hitzeschockprotein
IPTG	Isopropyl-thio-β-D-Galaktopyranosid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	lysogeny broth
LHC	Lichtsammelkomplex
log	Logarithmus
lon	<i>long cells</i> (lange Zellen)
m	mili (10 ⁻³)
M	Molar
Mb	Megabasen
MCS	multiple Klonierungsstelle
MCSI	<i>multiple cloning side I</i> (multiple Klonierungsstelle I)
MCSII	<i>multiple cloning side II</i> (multiple Klonierungsstelle II)
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Nano (10 ⁻⁹)
nbl	<i>non bleaching</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NtcA	<i>nitrogen transcription control</i>
Nostoc 7120	<i>Nostoc spec PCC 7120</i>
NRMSD	<i>normalized root mean square deviation</i> – normierte Standardabweichung
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBP	Phycobiliproteine
PBS	Phycobilisomen
PC	Phycocyanin
PEC	Phycoerythrocyanin
PCC	<i>Pasteur Culture Collection</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPH/TAP38	Protein Phosphatase 1/ Thylakoid assoziierte Phosphatase 38
PSI	Photosystem I (P700)
PSII	Photosystem II (P680)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
s.o.	siehe oben
SDS	Sodium(Natrium)-dodecylsulfat
sec	Sekunden
sp.	Spezies
<i>Synechocystis</i> 6803	<i>Synechocystis spec PCC 6803</i>
<i>Synechococcus</i> 7942	<i>Synechococcus elongatus PCC 7942</i>
TB	<i>terrific broth</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
TES	Tris(hydroxymethyl)methylaminoethansulfonsäure
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin
TRIS	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
ü. N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumenanteil pro Gesamtvolumen
Vol	Volumen
w/v	Massenanteil pro Gesamtvolumen
WR	Wildtyp

z. B.	zum Beispiel
-------	--------------

Literaturverzeichnis

- [1] Tandeau de Marsac, N und Houmard, J (1993): Adaption of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms, FEMS Microbiol Rev, Nr. 104, Seite 119-190.
- [2] Bhaya, D; Schwarz, R und Grossmann, A.R. (2000): Molecular responses to environmental stress, The Ecology of Cyanobacteria Seite 397-442, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [3] Whitton, Brian A. und Potts, Malcolm (2000): Introduction to the cyanobacteria, The Ecology of Cyanobacteria : Their Diversity in Time and Space Seite 1-11, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London, Boston.
- [4] Fuchs, Georg (2007): Oxygene phototrophe Bakterien (Cyanobakterien), Allgemeine Mikrobiologie Seite 409-413, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- [5] Schopf, J.W. (1993): Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life, Science, Nr. 260, Seite 640-646.
- [6] Douglas, S.E. (1994): Chloroplast origins and evolution, The molecular biology of cyanobacteria, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [7] Kaneko, T.; Sato, S.; Kotani, H.; Tanaka, A.; Asamizu, E.; Nakamura, Y.; Miyajima, N.; Hirose, M.; Sugiura, M.; Sasamoto, S.; Kimura, T.; Hosouchi, T.; Matsuno, A.; Muraki, A.; Nakazaki, N.; Naruo, K.; Okumura, S.; Shimpo, S.; Takeuchi, C.; Wada, T.; Watanabe, A.; Yamada, M.; Yasuda, M. und Tabata, S. (1996): Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement), DNA Res (Band 3), Nr. 3, Seite 185-209. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8905238>
- [8] Wolk, C.P.; Ernst, A und Elhai, J (1994): Heterocyst metabolism and development, The molecular biology of cyanobacteria, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [9] Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Wolk, C. P.; Kuritz, T.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Iriguchi, M.; Ishikawa, A.; Kawashima, K.; Kimura, T.; Kishida, Y.; Kohara, M.; Matsumoto, M.; Matsuno, A.; Muraki, A.; Nakazaki, N.; Shimpo, S.; Sugimoto, M.; Takazawa, M.; Yamada, M.; Yasuda, M. und Tabata, S. (2001): Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, DNA Res (Band 8), Nr. 5, Seite 205-13; 227-53.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11759840
- [10] Wolk, C. P.; Vonshak, A.; Kehoe, P. und Elhai, J. (1984): Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 81), Nr. 5, Seite 1561-5.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6324204
- [11] Wickner, S.; Maurizi, M. R. und Gottesman, S. (1999): Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins, Science (Band 286), Nr. 5446, Seite 1888-93.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10583944
- [12] McClellan, A. J.; Tam, S.; Kaganovich, D. und Frydman, J. (2005): Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations, Nat Cell Biol (Band 7), Nr. 8, Seite 736-41.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056264>
- [13] Striebel, F.; Kress, W. und Weber-Ban, E. (2009): Controlled destruction: AAA+ ATPases in protein degradation from bacteria to eukaryotes, Curr Opin Struct Biol (Band 19), Nr. 2, Seite 209-17. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19362814>
- [14] Snider, J. und Houry, W. A. (2008): AAA+ proteins: diversity in function, similarity in structure, Biochem Soc Trans (Band 36), Nr. Pt 1, Seite 72-7.

- [15] Bar-Nun, S. und Glickman, M. H. (2012): Proteasomal AAA-ATPases: structure and function, *Biochim Biophys Acta* (Band 1823), Nr. 1, Seite 67-82.
- [16] Bochtler, M.; Ditzel, L.; Groll, M.; Hartmann, C. und Huber, R. (1999): The proteasome, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* (Band 28), Seite 295-317.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10410804>
- [17] Gerth, U.; Kruger, E.; Derre, I.; Msadek, T. und Hecker, M. (1998): Stress induction of the *Bacillus subtilis* clpP gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance, *Mol Microbiol* (Band 28), Nr. 4, Seite 787-802. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9643546>
- [18] Msadek, T.; Dartois, V.; Kunst, F.; Herbaud, M. L.; Denizot, F. und Rapoport, G. (1998): ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation, *Mol Microbiol* (Band 27), Nr. 5, Seite 899-914. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9535081>
- [19] Damerau, K. und St John, A. C. (1993): Role of Clp protease subunits in degradation of carbon starvation proteins in *Escherichia coli*, *J Bacteriol* (Band 175), Nr. 1, Seite 53-63.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8416909>
- [20] Frees, D. und Ingmer, H. (1999): ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*, *Mol Microbiol* (Band 31), Nr. 1, Seite 79-87.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9987112>
- [21] Kruger, E.; Witt, E.; Ohlmeier, S.; Hanschke, R. und Hecker, M. (2000): The clp proteases of *Bacillus subtilis* are directly involved in degradation of misfolded proteins, *J Bacteriol* (Band 182), Nr. 11, Seite 3259-65. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10809708>
- [22] Schirmer, E. C.; Glover, J. R.; Singer, M. A. und Lindquist, S. (1996): HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions, *Trends Biochem Sci* (Band 21), Nr. 8, Seite 289-96.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8772382
- [23] Gottesman, S.; Wickner, S. und Maurizi, M. R. (1997): Protein quality control: triage by chaperones and proteases, *Genes Dev* (Band 11), Nr. 7, Seite 815-23.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9106654
- [24] Squires, C. und Squires, C. L. (1992): The Clp proteins: proteolysis regulators or molecular chaperones?, *J Bacteriol* (Band 174), Nr. 4, Seite 1081-5.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1735703>
- [25] Kim, Y. I.; Levchenko, I.; Fraczkowska, K.; Woodruff, R. V.; Sauer, R. T. und Baker, T. A. (2001): Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase, *Nat Struct Biol* (Band 8), Nr. 3, Seite 230-3.
- [26] Singh, S. K.; Rozycki, J.; Ortega, J.; Ishikawa, T.; Lo, J.; Steven, A. C. und Maurizi, M. R. (2001): Functional domains of the ClpA and ClpX molecular chaperones identified by limited proteolysis and deletion analysis, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 31, Seite 29420-9.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11346657
- [27] Joshi, S. A.; Hersch, G. L.; Baker, T. A. und Sauer, R. T. (2004): Communication between ClpX and ClpP during substrate processing and degradation, *Nat Struct Mol Biol* (Band 11), Nr. 5, Seite 404-11.
- [28] Gribun, A.; Kimber, M. S.; Ching, R.; Sprangers, R.; Fiebig, K. M. und Houry, W. A. (2005): The ClpP double ring tetradecameric protease exhibits plastic ring-ring interactions, and the N termini of its subunits form flexible loops that are essential for ClpXP and ClpAP complex formation, *J Biol Chem* (Band 280), Nr. 16, Seite 16185-96.
- [29] Bewley, M. C.; Graziano, V.; Griffin, K. und Flanagan, J. M. (2006): The asymmetry in the mature amino-terminus of ClpP facilitates a local symmetry match in ClpAP and ClpXP complexes, *J Struct Biol* (Band 153), Nr. 2, Seite 113-28.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16406682>

- [30] Martin, A.; Baker, T. A. und Sauer, R. T. (2007): Distinct static and dynamic interactions control ATPase-peptidase communication in a AAA+ protease, *Mol Cell* (Band 27), Nr. 1, Seite 41-52. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17612489>
- [31] Jennings, L. D.; Bohon, J.; Chance, M. R. und Licht, S. (2008): The ClpP N-terminus coordinates substrate access with protease active site reactivity, *Biochemistry* (Band 47), Nr. 42, Seite 11031-40. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18816064>
- [32] Sokolenko, A.; Pojidaeva, E.; Zinchenko, V.; Panichkin, V.; Glaser, V. M.; Herrmann, R. G. und Shestakov, S. V. (2002): The gene complement for proteolysis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis thaliana* chloroplasts, *Curr Genet* (Band 41), Nr. 5, Seite 291-310. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12185496>
- [33] Stanne, T. M.; Pojidaeva, E.; Andersson, F. I. und Clarke, A. K. (2007): Distinctive types of ATP-dependent Clp proteases in cyanobacteria, *J Biol Chem* (Band 282), Nr. 19, Seite 14394-402. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17371875
- [34] Schelin, J.; Lindmark, F. und Clarke, A. K. (2002): The clpP multigene family for the ATP-dependent Clp protease in the cyanobacterium *Synechococcus*, *Microbiology* (Band 148), Nr. Pt 7, Seite 2255-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12101312
- [35] Porankiewicz, J.; Schelin, J. und Clarke, A. K. (1998): The ATP-dependent Clp protease is essential for acclimation to UV-B and low temperature in the cyanobacterium *Synechococcus*, *Mol Microbiol* (Band 29), Nr. 1, Seite 275-83.
- [36] Herman, C.; Thevenet, D.; D'Ari, R. und Boulloc, P. (1995): Degradation of sigma 32, the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 92), Nr. 8, Seite 3516-20. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7724592>
- [37] Kihara, A.; Akiyama, Y. und Ito, K. (1995): FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 92), Nr. 10, Seite 4532-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7753838>
- [38] Tomoyasu, T.; Yuki, T.; Morimura, S.; Mori, H.; Yamanaka, K.; Niki, H.; Hiraga, S. und Ogura, T. (1993): The *Escherichia coli* FtsH protein is a prokaryotic member of a protein family of putative ATPases involved in membrane functions, cell cycle control, and gene expression, *J Bacteriol* (Band 175), Nr. 5, Seite 1344-51. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8444796>
- [39] Langer, T. (2000): AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins, *Trends Biochem Sci* (Band 25), Nr. 5, Seite 247-51. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10782097>
- [40] Lindahl, M.; Tabak, S.; Cseke, L.; Pichersky, E.; Andersson, B. und Adam, Z. (1996): Identification, characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial FtsH protease in chloroplasts of higher plants, *J Biol Chem* (Band 271), Nr. 46, Seite 29329-34. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910594>
- [41] Sakamoto, W.; Zaltsman, A.; Adam, Z. und Takahashi, Y. (2003): Coordinated regulation and complex formation of yellow variegated1 and yellow variegated2, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in *Arabidopsis* thylakoid membranes, *Plant Cell* (Band 15), Nr. 12, Seite 2843-55. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14630971>
- [42] Niwa, H.; Tsuchiya, D.; Makyio, H.; Yoshida, M. und Morikawa, K. (2002): Hexameric ring structure of the ATPase domain of the membrane-integrated metalloprotease FtsH from *Thermus thermophilus* HB8, *Structure* (Band 10), Nr. 10, Seite 1415-23. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12377127>
- [43] Kihara, A.; Akiyama, Y. und Ito, K. (1999): Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis, *EMBO J* (Band 18), Nr. 11, Seite 2970-81. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10357810>

- [44] Chiba, S.; Akiyama, Y.; Mori, H.; Matsuo, E. und Ito, K. (2000): Length recognition at the N-terminal tail for the initiation of FtsH-mediated proteolysis, *EMBO Rep* (Band 1), Nr. 1, Seite 47-52. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11256624>
- [45] Herman, C.; Prakash, S.; Lu, C. Z.; Matouschek, A. und Gross, C. A. (2003): Lack of a robust unfoldase activity confers a unique level of substrate specificity to the universal AAA protease FtsH, *Mol Cell* (Band 11), Nr. 3, Seite 659-69. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12667449>
- [46] Mann, N. H.; Novac, N.; Mullineaux, C. W.; Newman, J.; Bailey, S. und Robinson, C. (2000): Involvement of an FtsH homologue in the assembly of functional photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *FEBS Lett* (Band 479), Nr. 1-2, Seite 72-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10940391>
- [47] Baker, T. A. und Sauer, R. T. (2006): ATP-dependent proteases of bacteria: recognition logic and operating principles, *Trends Biochem Sci* (Band 31), Nr. 12, Seite 647-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17074491
- [48] Nixon, P. J.; Barker, M.; Boehm, M.; de Vries, R. und Komenda, J. (2005): FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress, *J Exp Bot* (Band 56), Nr. 411, Seite 357-63. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15545296>
- [49] Nixon, P. J.; Michoux, F.; Yu, J.; Boehm, M. und Komenda, J. (2010): Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II, *Ann Bot* (Band 106), Nr. 1, Seite 1-16. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20338950>
- [50] Silva, P.; Thompson, E.; Bailey, S.; Kruse, O.; Mullineaux, C. W.; Robinson, C.; Mann, N. H. und Nixon, P. J. (2003): FtsH is involved in the early stages of repair of photosystem II in *Synechocystis* sp PCC 6803, *Plant Cell* (Band 15), Nr. 9, Seite 2152-64. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12953117>
- [51] Komenda, J.; Barker, M.; Kuvikova, S.; de Vries, R.; Mullineaux, C. W.; Tichy, M. und Nixon, P. J. (2006): The FtsH protease slr0228 is important for quality control of photosystem II in the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803, *J Biol Chem* (Band 281), Nr. 2, Seite 1145-51. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16286465>
- [52] Goldberg, A. L.; Moerschell, R. P.; Chung, C. H. und Maurizi, M. R. (1994): ATP-dependent protease La (lon) from *Escherichia coli*, *Methods Enzymol* (Band 244), Seite 350-75. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7845219>
- [53] Chuang, S. E.; Burland, V.; Plunkett, G., 3rd; Daniels, D. L. und Blattner, F. R. (1993): Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the hslTS/ibpAB and hslVU operons in *Escherichia coli*, *Gene* (Band 134), Nr. 1, Seite 1-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8244018>
- [54] Parsell, D. A. und Lindquist, S. (1993): The Function of Heat-Shock Proteins in Stress Tolerance - Degradation and Reactivation of Damaged Proteins, *Annual Review of Genetics* (Band 27), Seite 437-496. URL: <Go to ISI>://WOS:A1993MM54000016
- [55] Feldman, D. E. und Frydman, J. (2000): Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones, *Current Opinion in Structural Biology* (Band 10), Nr. 1, Seite 26-33. URL: <Go to ISI>://WOS:000085529200003
- [56] Rosenzweig, R.; Moradi, S.; Zarrine-Afsar, A.; Glover, J. R. und Kay, L. E. (2013): Unraveling the Mechanism of Protein Disaggregation Through a ClpB-DnaK Interaction, *Science* (Band 339), Nr. 6123, Seite 1080-1083. URL: <Go to ISI>://WOS:000315452000043
- [57] Glover, J. R. und Lindquist, S. (1998): Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins, *Cell* (Band 94), Nr. 1, Seite 73-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9674429
- [58] Beyer, A. (1997): Sequence analysis of the AAA protein family, *Protein Sci* (Band 6), Nr. 10, Seite 2043-58. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9336829>

- [59] Sanchez, Y. und Lindquist, S. L. (1990): HSP104 required for induced thermotolerance, *Science* (Band 248), Nr. 4959, Seite 1112-5.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2188365>
- [60] Sanchez, Y.; Taulien, J.; Borkovich, K. A. und Lindquist, S. (1992): Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress, *EMBO J* (Band 11), Nr. 6, Seite 2357-64.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1600951>
- [61] Tomoyasu, T.; Gamer, J.; Bukau, B.; Kanemori, M.; Mori, H.; Rutman, A. J.; Oppenheim, A. B.; Yura, T.; Yamanaka, K.; Niki, H. und et al. (1995): *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor sigma 32, *EMBO J* (Band 14), Nr. 11, Seite 2551-60.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7781608>
- [62] Neuwald, A. F.; Aravind, L.; Spouge, J. L. und Koonin, E. V. (1999): AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes, *Genome Res* (Band 9), Nr. 1, Seite 27-43.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9927482>
- [63] Bochtler, M.; Hartmann, C.; Song, H. K.; Bourenkov, G. P.; Bartunik, H. D. und Huber, R. (2000): The structures of HslU and the ATP-dependent protease HslU-HslV, *Nature* (Band 403), Nr. 6771, Seite 800-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10693812>
- [64] Sousa, M. C.; Trame, C. B.; Tsuruta, H.; Wilbanks, S. M.; Reddy, V. S. und McKay, D. B. (2000): Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex, *Cell* (Band 103), Nr. 4, Seite 633-43. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11106733>
- [65] Ramachandran, R.; Hartmann, C.; Song, H. K.; Huber, R. und Bochtler, M. (2002): Functional interactions of HslV (ClpQ) with the ATPase HslU (ClpY), *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 99), Nr. 11, Seite 7396-401. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032294>
- [66] Dougan, D. A.; Mogk, A.; Zeth, K.; Turgay, K. und Bukau, B. (2002): AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime, *FEBS Lett* (Band 529), Nr. 1, Seite 6-10.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12354604
- [67] Hanson, P. I. und Whiteheart, S. W. (2005): AAA+ proteins: have engine, will work, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 6), Nr. 7, Seite 519-29.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16072036>
- [68] Wang, J.; Song, J. J.; Franklin, M. C.; Kamtekar, S.; Im, Y. J.; Rho, S. H.; Seong, I. S.; Lee, C. S.; Chung, C. H. und Eom, S. H. (2001): Crystal structures of the HslVU peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism, *Structure* (Band 9), Nr. 2, Seite 177-84. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11250202>
- [69] Hinnerwisch, J.; Fenton, W. A.; Furtak, K. J.; Farr, G. W. und Horwich, A. L. (2005): Loops in the central channel of ClpA chaperone mediate protein binding, unfolding, and translocation, *Cell* (Band 121), Nr. 7, Seite 1029-41. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15989953>
- [70] Martin, A.; Baker, T. A. und Sauer, R. T. (2008): Pore loops of the AAA+ ClpX machine grip substrates to drive translocation and unfolding, *Nat Struct Mol Biol* (Band 15), Nr. 11, Seite 1147-51. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18931677>
- [71] Wang, J.; Song, J. J.; Seong, I. S.; Franklin, M. C.; Kamtekar, S.; Eom, S. H. und Chung, C. H. (2001): Nucleotide-dependent conformational changes in a protease-associated ATPase HslU, *Structure* (Band 9), Nr. 11, Seite 1107-16.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709174>
- [72] Suno, R.; Niwa, H.; Tsuchiya, D.; Zhang, X.; Yoshida, M. und Morikawa, K. (2006): Structure of the whole cytosolic region of ATP-dependent protease FtsH, *Mol Cell* (Band 22), Nr. 5, Seite 575-85. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16762831>
- [73] Bieniossek, C.; Schalch, T.; Bumann, M.; Meister, M.; Meier, R. und Baumann, U. (2006): The molecular architecture of the metalloprotease FtsH, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 103), Nr. 9, Seite 3066-71. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16484367>

- [74] Varshavsky, A. (1991): Naming a targeting signal, *Cell* (Band 64), Nr. 1, Seite 13-5.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1986863>
- [75] Ravid, T. und Hochstrasser, M. (2008): Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 9), Nr. 9, Seite 679-90.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18698327>
- [76] Gottesman, S.; Roche, E.; Zhou, Y. und Sauer, R. T. (1998): The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system, *Genes Dev* (Band 12), Nr. 9, Seite 1338-47.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9573050
- [77] Keiler, K. C.; Waller, P. R. und Sauer, R. T. (1996): Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA, *Science* (Band 271), Nr. 5251, Seite 990-3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8584937>
- [78] Tu, G. F.; Reid, G. E.; Zhang, J. G.; Moritz, R. L. und Simpson, R. J. (1995): C-terminal extension of truncated recombinant proteins in *Escherichia coli* with a 10Sa RNA decapeptide, *J Biol Chem* (Band 270), Nr. 16, Seite 9322-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7536743>
- [79] Varshavsky, A. (1996): The N-end rule: functions, mysteries, uses, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 22, Seite 12142-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8901547>
- [80] Mogk, A.; Schmidt, R. und Bukau, B. (2007): The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies, *Trends Cell Biol* (Band 17), Nr. 4, Seite 165-72. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17306546>
- [81] Erbse, A.; Schmidt, R.; Bornemann, T.; Schneider-Mergener, J.; Mogk, A.; Zahn, R.; Dougan, D. A. und Bukau, B. (2006): ClpS is an essential component of the N-end rule pathway in *Escherichia coli*, *Nature* (Band 439), Nr. 7077, Seite 753-6.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16467841>
- [82] Krogmann, D. W. (1973): Photosynthetic Reactions and Components of Thylakoids, *The biology of blue-green algae*, BERKELEY AND LOS ANGELES, UNIVERSITY OF CALIFORNIA PRESS, 3 FIG, 80-98, NSF GB 27466, <http://md1.csa.com/partners/viewrecord.php?requester=gs&collection=ENV&recid=7412566&q=Photosynthetic+Reactions+and+Components+of+Thylakoids&uid=791648688&setcookie=yes>
- [83] Chereskin, B. M.; Clement-Metral, J. D. und Gantt, E. (1985): Characterization of a Purified Photosystem II-Phycobilisome Particle Preparation from *Porphyridium cruentum*, *Plant Physiol* (Band 77), Nr. 3, Seite 626-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16664110>
- [84] Kuhl, H.; Rögner, M.; Van Breemen, J. F. und Boekema, E. J. (1999): Localization of cyanobacterial photosystem II donor-side subunits by electron microscopy and the supramolecular organization of photosystem II in the thylakoid membrane, *Eur J Biochem* (Band 266), Seite 453-459.
- [85] Mörschel, E. und Schatz, G. H. (1987): Correlation of photosystem-II complexes with exoplasmatic freeze-fracture particles of thylakoids of the cyanobacterium *Synechococcus* sp., *Planta* (Band 172), Seite 145-154.
- [86] Clement-Metral, J. D.; Gantt, E. und Redlinger, T. (1985): A photosystem II-phycobilisome preparation from the red alga, *Porphyridium cruentum*: oxygen evolution, ultrastructure, and polypeptide resolution, *Arch Biochem Biophys* (Band 238), Nr. 1, Seite 10-7.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2580484>
- [87] Mullineaux, C. W. und Emlyn-Jones, D. (2005): State transitions: an example of acclimation to low-light stress, *J Exp Bot* (Band 56), Nr. 411, Seite 389-93.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15582926>
- [88] Yang, S.; Zhang, R.; Hu, C.; Xie, J. und Zhao, J. (2009): The dynamic behavior of phycobilisome movement during light state transitions in cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803, *Photosynth Res* (Band 99), Nr. 2, Seite 99-106.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19130288>

- [89] Gantt, E. (1980): Structure and function of phycobilisomes: light harvesting pigment complexes in red and blue-green algae., *Int Rev Cyt* (Band 66), Seite 45-80.
- [90] Nies, M. und Wehrmeyer, W. (1980): Isolation and biliprotein characterization of phycobilisomes from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* Cohn, *Planta* (Band 150), Seite 330-337.
- [91] Ducret, A.; Muller, S. A.; Goldie, K. N.; Hefti, A.; Sidler, W. A.; Zuber, H. und Engel, A. (1998): Reconstitution, characterisation and mass analysis of the pentacylindrical allophycocyanin core complex from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120, *J Mol Biol* (Band 278), Nr. 2, Seite 369-88. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9571058>
- [92] Ducret, A.; Sidler, W.; Wehrli, E.; Frank, G. und Zuber, H. (1996): Isolation, characterization and electron microscopy analysis of a hemidisoidal phycobilisome type from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120, *Eur J Biochem* (Band 236), Nr. 3, Seite 1010-24. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8665889
- [93] MacColl, R. (1998): Cyanobacterial phycobilisomes, *J Struct Biol* (Band 124), Nr. 2-3, Seite 311-34. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10049814>
- [94] Sidler, W. (1994): Phycobilisomes und phycobiliprotein structures, Bryant, D.A., *Phycobilisomes und phycobiliprotein structures*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 139-216
- [95] Yamanaka, G.; Glazer, A. N. und Williams, R. C. (1980): Molecular architecture of a light-harvesting antenna. Comparison of wild type and mutant *Synechococcus* 6301 phycobilisomes, *J Biol Chem* (Band 255), Nr. 22, Seite 11104-10. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6776125>
- [96] Williams, R. C.; Gingrich, J. C. und Glazer, A. N. (1980): Cyanobacterial phycobilisomes. Particles from *Synechocystis* 6701 and two pigment mutants, *J Cell Biol* (Band 85), Nr. 3, Seite 558-66. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6771296>
- [97] Glauser, M.; Bryant, D. A.; Frank, G.; Wehrli, E.; Rusconi, S. S.; Sidler, W. und Zuber, H. (1992): Phycobilisome structure in the cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Anabaena* sp. PCC 7120, *Eur J Biochem* (Band 205), Nr. 3, Seite 907-15. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1577008>
- [98] Grossman, A. R.; Schaefer, M. R.; Chiang, G. G. und Collier, J. L. (1993): The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions, *Microbiol Rev* (Band 57), Nr. 3, Seite 725-49. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8246846
- [99] Ficner, R.; Lobeck, K.; Schmidt, G. und Huber, R. (1992): Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of B-phycoerythrin from the red alga *Porphyridium sordidum* at 2.2 Å resolution, *J Mol Biol* (Band 228), Nr. 3, Seite 935-50. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1469725>
- [100] Glazer, A. N. (1988): Phycobiliproteins, *Methods Enzymol* (Band 167), Seite 291-303. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3148835
- [101] Glazer, A. N. (1989): Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna, *J Biol Chem* (Band 264), Nr. 1, Seite 1-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2491842>
- [102] Apt, K. E.; Collier, J. L. und Grossman, A. R. (1995): Evolution of the phycobiliproteins, *J Mol Biol* (Band 248), Nr. 1, Seite 79-96. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7731046
- [103] Gray, B. H. und Gantt, E. (1975): Spectral properties of phycobilisomes and phycobiliproteins from the blue-green alga *Nostoc* sp, *Photochem Photobiol* (Band 21), Nr. 2, Seite 121-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/806082>

- [104] Bald, D.; Kruip, J. und Rögner, M. (1996): Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: How is the phycobilisome connected with the photosystems?, *Photosyn. Res.* (Band 49), Seite 103-118.
- [105] Bishop, J.E.; Rapoport, H.; Klotz, A.V.; Chan, C.F.; Glazer, A.N.; Füglistaller, P und Zuber, H. (1987): Chromopeptides from phycoerythrocyanin: Structure and linkage of the three bilin groups., *J. Am. Chem. Soc* (Band 109), Seite 857-881.
- [106] van de Meene, A. M.; Hohmann-Marriott, M. F.; Vermaas, W. F. und Roberson, R. W. (2006): The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Arch Microbiol* (Band 184), Nr. 5, Seite 259-70.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16320037>
- [107] Vogelmann, T.C. und Scheibe, J (1978): Action spectra for chromatic adaptation in the blue-green alga *Fremyella diplosiphon*, *Planta* (Band 143), Seite 233-239.
- [108] Grossman, A.R.; Lemaux, P.G.; Conley, P.B.; Bruns, B.U. und Anderson, L.K. (1988): Characterization of phycobiliprotein and linker polypeptide genes in *Fremyella diplosiphon* and their regulated expression during complementary chromatic adaptation, *Photosyn. Res.* (Band 17), Seite 23-56.
- [109] Grossman, A.R. und Kehoe, D.M. (1997): Phosphorelay control of phycobilisomes biogenesis during complementary chromatic adaptation, *Photosyn. Res.* (Band 53), Seite 95-108.
- [110] Tandeau de Marsac, N. (1977): Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria, *J Bacteriol* (Band 130), Nr. 1, Seite 82-91.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/856789>
- [111] Stowe-Evans, E. L.; Ford, J. und Kehoe, D. M. (2004): Genomic DNA microarray analysis: identification of new genes regulated by light color in the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*, *J Bacteriol* (Band 186), Nr. 13, Seite 4338-49.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15205436>
- [112] Terauchi, K.; Montgomery, B. L.; Grossman, A. R.; Lagarias, J. C. und Kehoe, D. M. (2004): RcaE is a complementary chromatic adaptation photoreceptor required for green and red light responsiveness, *Mol Microbiol* (Band 51), Nr. 2, Seite 567-77.
- [113] Seib, L. O. und Kehoe, D. M. (2002): A turquoise mutant genetically separates expression of genes encoding phycoerythrin and its associated linker peptides, *J Bacteriol* (Band 184), Nr. 4, Seite 962-70.
- [114] Alvey, R. M.; Karty, J. A.; Roos, E.; Reilly, J. P. und Kehoe, D. M. (2003): Lesions in phycoerythrin chromophore biosynthesis in *Fremyella diplosiphon* reveal coordinated light regulation of apoprotein and pigment biosynthetic enzyme gene expression, *Plant Cell* (Band 15), Nr. 10, Seite 2448-63.
- [115] Kahn, K.; Mazel, D.; Houmard, J.; Tandeau de Marsac, N. und Schaefer, M. R. (1997): A role for cpeYZ in cyanobacterial phycoerythrin biosynthesis, *J Bacteriol* (Band 179), Nr. 4, Seite 998-1006.
- [116] Gutu, A. und Kehoe, D. M. (2012): Emerging perspectives on the mechanisms, regulation, and distribution of light color acclimation in cyanobacteria, *Mol Plant* (Band 5), Nr. 1, Seite 1-13.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21772031>
- [117] Kehoe, D. M. (2010): Chromatic adaptation and the evolution of light color sensing in cyanobacteria, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 107), Nr. 20, Seite 9029-30.
- [118] Kaneko, Y.; Danev, R.; Nagayama, K. und Nakamoto, H. (2006): Intact carboxysomes in a cyanobacterial cell visualized by hilbert differential contrast transmission electron microscopy, *J Bacteriol* (Band 188), Nr. 2, Seite 805-8.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16385071>
- [119] Kaplan, A. und Reinhold, L. (1999): CO₂ Concentrating Mechanisms in Photosynthetic Microorganisms, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* (Band 50), Seite 539-570.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15012219>
- [120] Giordano, M.; Beardall, J. und Raven, J. A. (2005): CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution, *Annu Rev Plant Biol* (Band 56), Seite 99-131. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862091>

- [121] Pearce, J.; Leach, C. K. und Carr, N. G. (1969): The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga *Anabaena variabilis*, *J Gen Microbiol* (Band 55), Nr. 3, Seite 371-8.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5783887>
- [122] Hagen, K. D. und Meeks, J. C. (2001): The unique cyanobacterial protein OpcA is an allosteric effector of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 15, Seite 11477-86.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152472>
- [123] Scanlan, D. J.; Sundaram, S.; Newman, J.; Mann, N. H. und Carr, N. G. (1995): Characterization of a *zwf* mutant of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942, *J Bacteriol* (Band 177), Nr. 9, Seite 2550-3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7730289>
- [124] Summers, M. L. und Meeks, J. C. (1996): Transcriptional regulation of *zwf*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, from the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133, *Mol Microbiol* (Band 22), Nr. 3, Seite 473-80.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8939431>
- [125] Summers, M. L.; Wallis, J. G.; Campbell, E. L. und Meeks, J. C. (1995): Genetic evidence of a major role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in nitrogen fixation and dark growth of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC 29133, *J Bacteriol* (Band 177), Nr. 21, Seite 6184-94. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592384>
- [126] Yang, C.; Hua, Q. und Shimizu, K. (2002): Integration of the information from gene expression and metabolic fluxes for the analysis of the regulatory mechanisms in *Synechocystis*, *Appl Microbiol Biotechnol* (Band 58), Nr. 6, Seite 813-22.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021803>
- [127] Zhang, S. und Bryant, D. A. (2011): The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria, *Science* (Band 334), Nr. 6062, Seite 1551-3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22174252>
- [128] O'Neill, G. P.; Peterson, D. M.; Schon, A.; Chen, M. W. und Soll, D. (1988): Formation of the chlorophyll precursor delta-aminolevulinic acid in cyanobacteria requires aminoacylation of a tRNAGlu species, *J Bacteriol* (Band 170), Nr. 9, Seite 3810-6.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2900830>
- [129] Meeks, J. C. (2011): Microbiology. Closing the cycle, *Science* (Band 334), Nr. 6062, Seite 1508-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22174240>
- [130] Cai, Y. und Wolk, C. P. (1997): Nitrogen deprivation of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 elicits rapid activation of a gene cluster that is essential for uptake and utilization of nitrate, *J Bacteriol* (Band 179), Nr. 1, Seite 258-66.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8982006>
- [131] Frias, J. E.; Flores, E. und Herrero, A. (1997): Nitrate assimilation gene cluster from the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *J Bacteriol* (Band 179), Nr. 2, Seite 477-86. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8990301>
- [132] Maeda, S. und Omata, T. (1997): Substrate-binding lipoprotein of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 involved in the transport of nitrate and nitrite, *J Biol Chem* (Band 272), Nr. 5, Seite 3036-41. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9006953>
- [133] Guerrero, A. C.; Vega, M. C. und Losada, M. (1981): The Assimilatory Nitrate-Reducing System and its Regulation, *Annual Review of Plant Physiology* (Band 32), Seite 169-204.
- [134] Luque, I.; Flores, E. und Herrero, A. (1994): Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria, *EMBO J* (Band 13), Nr. 23, Seite 5794.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7988576>
- [135] Flores, E.; Frias, J. E.; Rubio, L. M. und Herrero, A. (2005): Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria, *Photosynth Res* (Band 83), Nr. 2, Seite 117-33.
- [136] Flores, Enrique; Guerrero, MiguelG und Losada, Manuel (1980): Short-term ammonium inhibition of nitrate utilization by *Anacystis nidulans* and other cyanobacteria, *Archives of Microbiology* (Band 128), Nr. 2, Seite 137-144. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00406150>
- [137] Muro-Pastor, M. I.; Reyes, J. C. und Florencio, F. J. (2005): Ammonium assimilation in cyanobacteria, *Photosynth Res* (Band 83), Nr. 2, Seite 135-50.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16143848>

- [138] Luque, I. und Forchhammer, K. (2008): Nitrogen Assimilation and C/N Balance Sensing, A., Herrero und E., Flores. The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution, Caister Academic Press, 335-382
- [139] Meeks, J. C.; Wolk, C. P.; Lockau, W.; Schilling, N.; Shaffer, P. W. und Chien, W. S. (1978): Pathways of assimilation of $[^{13}\text{N}]\text{N}_2$ and $^{13}\text{NH}_4^+$ by cyanobacteria with and without heterocysts, J Bacteriol (Band 134), Nr. 1, Seite 125-30.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/418057>
- [140] Flores, E. und Herrero, A. (1994): Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation, The Molecular Biology of Cyanobacteria, Kluwer Academic Publishers: Dodrecht, 487-517
- [141] Forchhammer, K. und Hedler, A. (1997): Phosphoprotein PII from cyanobacteria--analysis of functional conservation with the PII signal-transduction protein from Escherichia coli, Eur J Biochem (Band 244), Nr. 3, Seite 869-75.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9108259>
- [142] Stoeckel, J.; Welsh, E. A.; Liberton, M.; Kunnvakkam, R.; Aurora, R. und Pakrasi, H. B. (2008): Global transcriptomic analysis of Cyanotheca 51142 reveals robust diurnal oscillation of central metabolic processes, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Band 105), Nr. 16, Seite 6156-6161. URL: <Go to ISI>://WOS:000255356000038
- [143] Dunn, J. H. und Wolk, C. P. (1970): Composition of the cellular envelopes of Anabaena cylindrica, J Bacteriol (Band 103), Nr. 1, Seite 153-8.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4987305>
- [144] Cardemil, L. und Wolk, C. P. (1979): The polysaccharides from heterocyst and spore envelopes of a blue-green alga. Structure of the basic repeating unit, J Biol Chem (Band 254), Nr. 3, Seite 736-41. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/104995>
- [145] Cardemil, L. und Wolk, C. P. (1976): The polysaccharides from heterocyst and spore envelopes of a blue-green alga. Methylation analysis and structure of the backbones, J Biol Chem (Band 251), Nr. 10, Seite 2967-75. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/818084>
- [146] Forchhammer, K. (2008): P(II) signal transducers: novel functional and structural insights, Trends Microbiol (Band 16), Nr. 2, Seite 65-72.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18182294>
- [147] Forchhammer, K. und Tandeau de Marsac, N. (1994): The PII protein in the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status, J Bacteriol (Band 176), Nr. 1, Seite 84-91.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8282715>
- [148] Vega-Palas, M. A.; Flores, E. und Herrero, A. (1992): NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium Synechococcus that belongs to the Crp family of bacterial regulators, Mol Microbiol (Band 6), Nr. 13, Seite 1853-9.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1630321>
- [149] Vega-Palas, M. A.; Madueno, F.; Herrero, A. und Flores, E. (1990): Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7942, J Bacteriol (Band 172), Nr. 2, Seite 643-7.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1967601>
- [150] Herrero, A.; Muro-Pastor, A. M. und Flores, E. (2001): Nitrogen control in cyanobacteria, J Bacteriol (Band 183), Nr. 2, Seite 411-25.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133933>
- [151] Blazquez-del-Toro, Jose M.; Fisteus, Jesus Arias; Centeno, Vicente Luque und Sanchez-Fernandez, Luis (2008): A semantic similarity measure in the context of semantic queries, International Journal of Computer Applications in Technology (Band 33), Nr. 4, Seite 285-291.
- [152] Muro-Pastor, A. M.; Valladares, A.; Flores, E. und Herrero, A. (2002): Mutual dependence of the expression of the cell differentiation regulatory protein HetR and the global nitrogen regulator NtcA during heterocyst development, Mol Microbiol (Band 44), Nr. 5, Seite 1377-85. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12068814>

- [153] Muro-Pastor, A. M.; Kuritz, T.; Flores, E.; Herrero, A. und Wolk, C. P. (1994): Transfer of a genetic marker from a megaplasmid of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to a megaplasmid of a different *Anabaena* strain, *J Bacteriol* (Band 176), Nr. 4, Seite 1093-8.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8106321>
- [154] Ramasubramanian, T. S.; Wei, T. F. und Golden, J. W. (1994): Two *Anabaena* sp. strain PCC 7120 DNA-binding factors interact with vegetative cell- and heterocyst-specific genes, *J Bacteriol* (Band 176), Nr. 5, Seite 1214-23.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8113160>
- [155] Su, Z.; Mao, F.; Dam, P.; Wu, H.; Olman, V.; Paulsen, I. T.; Palenik, B. und Xu, Y. (2006): Computational inference and experimental validation of the nitrogen assimilation regulatory network in cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH 8102, *Nucleic Acids Res* (Band 34), Nr. 3, Seite 1050-65. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473855>
- [156] Su, Z.; Olman, V.; Mao, F. und Xu, Y. (2005): Comparative genomics analysis of NtcA regulons in cyanobacteria: regulation of nitrogen assimilation and its coupling to photosynthesis, *Nucleic Acids Res* (Band 33), Nr. 16, Seite 5156-71.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16157864>
- [157] Espinosa, J.; Forchhammer, K.; Burillo, S. und Contreras, A. (2006): Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA, *Mol Microbiol* (Band 61), Nr. 2, Seite 457-69.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16796668>
- [158] Green, L. S. und Grossman, A. R. (1988): Changes in sulfate transport characteristics and protein composition of *Anacystis nidulans* R2 during sulfur deprivation, *J Bacteriol* (Band 170), Nr. 2, Seite 583-7.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3123460
- [159] Laudenbach, D. E. und Grossman, A. R. (1991): Characterization and mutagenesis of sulfur-regulated genes in a cyanobacterium: evidence for function in sulfate transport, *J Bacteriol* (Band 173), Nr. 9, Seite 2739-50.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1708375
- [160] Block, M. A. und Grossman, A. R. (1988): Identification and Purification of a Derepressible Alkaline Phosphatase from *Anacystis nidulans* R2, *Plant Physiol* (Band 86), Nr. 4, Seite 1179-1184.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16666051
- [161] Ray, J. M.; Bhaya, D.; Block, M. A. und Grossman, A. R. (1991): Isolation, transcription, and inactivation of the gene for an atypical alkaline phosphatase of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942, *J Bacteriol* (Band 173), Nr. 14, Seite 4297-309.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1712356
- [162] Valladares, A.; Flores, E. und Herrero, A. (2008): Transcription activation by NtcA and 2-oxoglutarate of three genes involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *J Bacteriol* (Band 190), Nr. 18, Seite 6126-33.
- [163] Olmedo-Verd, E.; Valladares, A.; Flores, E.; Herrero, A. und Muro-Pastor, A. M. (2008): Role of two NtcA-binding sites in the complex ntcA gene promoter of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *J Bacteriol* (Band 190), Nr. 22, Seite 7584-90.
- [164] Black, T. A.; Cai, Y. und Wolk, C. P. (1993): Spatial expression and autoregulation of hetR, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*, *Mol Microbiol* (Band 9), Nr. 1, Seite 77-84.
- [165] Yoon, H. S. und Golden, J. W. (2001): PatS and products of nitrogen fixation control heterocyst pattern, *J Bacteriol* (Band 183), Nr. 8, Seite 2605-13.
- [166] Yoon, H. S. und Golden, J. W. (1998): Heterocyst pattern formation controlled by a diffusible peptide, *Science* (Band 282), Nr. 5390, Seite 935-8.

- [167] Liang, J.; Scappino, L. und Haselkorn, R. (1992): The *patA* gene product, which contains a region similar to CheY of *Escherichia coli*, controls heterocyst pattern formation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 89), Nr. 12, Seite 5655-9.
- [168] Makarova, K. S.; Koonin, E. V.; Haselkorn, R. und Galperin, M. Y. (2006): Cyanobacterial response regulator PatA contains a conserved N-terminal domain (PATAN) with an alpha-helical insertion, *Bioinformatics* (Band 22), Nr. 11, Seite 1297-301.
- [169] Flores, E. und Herrero, A. (2010): Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria, *Nat Rev Microbiol* (Band 8), Nr. 1, Seite 39-50.
- [170] Allen, M. M. (1984): Cyanobacterial cell inclusions, *Annu Rev Microbiol* (Band 38), Seite 1-25. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6437321>
- [171] Hai, T.; Hein, S. und Steinbuchel, A. (2001): Multiple evidence for widespread and general occurrence of type-III PHA synthases in cyanobacteria and molecular characterization of the PHA synthases from two thermophilic cyanobacteria: *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 and *Synechococcus* sp. strain MA19, *Microbiology* (Band 147), Nr. Pt 11, Seite 3047-60. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700355>
- [172] Adir, N.; Zer, H.; Shochat, S. und Ohad, I. (2003): Photoinhibition - a historical perspective, *Photosynth Res* (Band 76), Nr. 1-3, Seite 343-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16228592
- [173] Collier, J. L. und Grossman, A. R. (1992): Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same, *J Bacteriol* (Band 174), Nr. 14, Seite 4718-26. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1624459
- [174] Barker-Astrom, K.; Schelin, J.; Gustafsson, P.; Clarke, A. K. und Campbell, D. A. (2005): Chlorosis during nitrogen starvation is altered by carbon dioxide and temperature status and is mediated by the ClpP1 protease in *Synechococcus elongatus*, *Arch Microbiol* (Band 183), Nr. 1, Seite 66-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549267>
- [175] Li, H. und Sherman, L. A. (2002): Characterization of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and *deltanbl* mutants under nitrogen-deficient conditions, *Arch Microbiol* (Band 178), Nr. 4, Seite 256-66. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12209258
- [176] Görl, M.; Sauer, J.; Baier, T. und Forchhammer, K. (1998): Nitrogen-starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942: adaptation to long-term survival, *Microbiology* (Band 144 (Pt 9)), Seite 2449-58. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9782492
- [177] Sauer, J.; Schreiber, U.; Schmid, R.; Volker, U. und Forchhammer, K. (2001): Nitrogen starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942. Low-level photosynthesis as a mechanism of long-term survival, *Plant Physiol* (Band 126), Nr. 1, Seite 233-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11351086
- [178] Ke, S. und Haselkorn, R. (2013): Fluorescence spectroscopy study of heterocyst differentiation in *Anabaena* PCC 7120 filaments, *Microbiology* (Band 159), Nr. Pt 2, Seite 253-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23223442>
- [179] Dolganov, N. und Grossman, A. R. (1999): A polypeptide with similarity to phycocyanin alpha-subunit phycocyanobilin lyase involved in degradation of phycobilisomes, *J Bacteriol* (Band 181), Nr. 2, Seite 610-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9882677
- [180] Sendersky, E.; Lahmi, R.; Shaltiel, J.; Perelman, A. und Schwarz, R. (2005): NblC, a novel component required for pigment degradation during starvation in *Synechococcus* PCC 7942,

- Mol Microbiol (Band 58), Nr. 3, Seite 659-68.
 URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16238617
- [181] Schwarz, R. und Grossman, A. R. (1998): A response regulator of cyanobacteria integrates diverse environmental signals and is critical for survival under extreme conditions, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 95), Nr. 18, Seite 11008-13.
 URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9724820
- [182] van Waasbergen, L. G.; Dolganov, N. und Grossman, A. R. (2002): nbIS, a gene involved in controlling photosynthesis-related gene expression during high light and nutrient stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942, J Bacteriol (Band 184), Nr. 9, Seite 2481-90.
 URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11948163
- [183] Lahmi, R.; Sendersky, E.; Perelman, A.; Hagemann, M.; Forchhammer, K. und Schwarz, R. (2006): Alanine dehydrogenase activity is required for adequate progression of phycobilisome degradation during nitrogen starvation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942, J Bacteriol (Band 188), Nr. 14, Seite 5258-65.
 URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16816198
- [184] Salinas, P.; Ruiz, D.; Cantos, R.; Lopez-Redondo, M. L.; Marina, A. und Contreras, A. (2007): The regulatory factor SipA provides a link between NbIS and NbIR signal transduction pathways in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942, Mol Microbiol (Band 66), Nr. 6, Seite 1607-19.
 URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18004983
- [185] Kappell, A. D.; Bhaya, D. und van Waasbergen, L. G. (2006): Negative control of the high light-inducible hliA gene and implications for the activities of the NbIS sensor kinase in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942, Arch Microbiol (Band 186), Nr. 5, Seite 403-13. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16897032>
- [186] Kato, H.; Kubo, T.; Hayashi, M.; Kobayashi, I.; Yagasaki, T.; Chibazakura, T.; Watanabe, S. und Yoshikawa, H. (2011): Interactions between histidine kinase NbIS and the response regulators RpaB and SrrA are involved in the bleaching process of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942, Plant Cell Physiol (Band 52), Nr. 12, Seite 2115-22.
- [187] Karradt, A.; Sobanski, J.; Mattow, J.; Lockau, W. und Baier, K. (2008): NbIA, a key protein of phycobilisome degradation, interacts with ClpC, a HSP100 chaperone partner of a cyanobacterial Clp protease, J Biol Chem (Band 283), Nr. 47, Seite 32394-32403.
 URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18818204
- [188] Collier, J. L. und Grossman, A. R. (1994): A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria, EMBO J (Band 13), Nr. 5, Seite 1039-47.
 URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8131738
- [189] Baier, K.; Nicklisch, S.; Grundner, C.; Reinecke, J. und Lockau, W. (2001): Expression of two nbIA-homologous genes is required for phycobilisome degradation in nitrogen-starved *Synechocystis* sp. PCC6803, FEMS Microbiol Lett (Band 195), Nr. 1, Seite 35-9.
 URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11166992
- [190] Richaud, C.; Zabulon, G.; Joder, A. und Thomas, J. C. (2001): Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the nbIA gene in *Synechocystis* strain PCC 6803, J Bacteriol (Band 183), Nr. 10, Seite 2989-94.
 URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11325925

- [191] Baier, K.; Lehmann, H.; Stephan, D. P. und Lockau, W. (2004): NblA is essential for phycobilisome degradation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 but not for development of functional heterocysts, *Microbiology* (Band 150), Nr. Pt 8, Seite 2739-49.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15289570
- [192] Bienert, R.; Baier, K.; Volkmer, R.; Lockau, W. und Heinemann, U. (2006): Crystal structure of NblA from *Anabaena* sp. PCC 7120, a small protein playing a key role in phycobilisome degradation, *J Biol Chem* (Band 281), Nr. 8, Seite 5216-23.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16356935
- [193] Dines, M.; Sendersky, E.; David, L.; Schwarz, R. und Adir, N. (2008): Structural, Functional, and Mutational Analysis of the NblA Protein Provides Insight into Possible Modes of Interaction with the Phycobilisome, *J Biol Chem* (Band 283), Nr. 44, Seite 30330-30340.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18718907
- [194] Luque, I.; Ochoa De Alda, J. A.; Richaud, C.; Zabulon, G.; Thomas, J. C. und Houmard, J. (2003): The NblA protein from the filamentous cyanobacterium *Tolypothrix* PCC 7601: regulation of its expression and interactions with phycobilisome components, *Mol Microbiol* (Band 50), Nr. 3, Seite 1043-54.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14617160
- [195] Karradt, A. (2009): Stressinduzierter Abbau von Phycobilisomen: Zur Funktion des Schlüsselpoteins NblA
- [196] Zinchenko, V. V.; Piven, I. V.; Melnik, V. A und Shestakov, S. V. (1999): Vectors for the complementation analysis of cyanobacterial mutants, *Russ J Genet* (Band 35), Seite 228-232.
- [197] Nygren, P. A.; Stahl, S. und Uhlen, M. (1994): Engineering proteins to facilitate bioprocessing, *Trends Biotechnol* (Band 12), Nr. 5, Seite 184-8.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7764901>
- [198] Frangioni, J. V. und Neel, B. G. (1993): Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins, *Anal Biochem* (Band 210), Nr. 1, Seite 179-87. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8489015>
- [199] Whitmore, L. und Wallace, B. A. (2008): Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases, *Biopolymers* (Band 89), Nr. 5, Seite 392-400. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17896349>
- [200] Whitmore, L. und Wallace, B. A. (2004): DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Res* (Band 32), Nr. Web Server issue, Seite W668-73. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215473>
- [201] Lobley, A.; Whitmore, L. und Wallace, B. A. (2002): DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra, *Bioinformatics* (Band 18), Nr. 1, Seite 211-2. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11836237>
- [202] Schindler, M und Banning, C (2010): Analyse von Protein-Interaktionen durch FRET und FACS, *Biospektrum* (Band 3), Nr. 16, Seite 298-302.
- [203] Rizzo, M. A.; Springer, G. H.; Granada, B. und Piston, D. W. (2004): An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET, *Nat Biotechnol* (Band 22), Nr. 4, Seite 445-9.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14990965
- [204] Zacharias, D. A. (2002): Sticky caveats in an otherwise glowing report: oligomerizing fluorescent proteins and their use in cell biology, *Sci STKE* (Band 2002), Nr. 131, Seite pe23.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11997581
- [205] Clarke, A. K. und Eriksson, M. J. (1996): The cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 possesses a close homologue to the chloroplast ClpC protein of higher plants, *Plant Mol Biol* (Band 31), Nr. 4, Seite 721-30.

- URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8806403
- [206] Andersson, F. I.; Tryggvesson, A.; Sharon, M.; Diemand, A. V.; Classen, M.; Best, C.; Schmidt, R.; Schelin, J.; Stanne, T. M.; Bukau, B.; Robinson, C. V.; Witt, S.; Mogk, A. und Clarke, A. K. (2009): Structure and function of a novel type of ATP-dependent Clp protease, *J Biol Chem* (Band 284), Nr. 20, Seite 13519-32.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19237538
- [207] Kress, W.; Maglica, Z. und Weber-Ban, E. (2009): Clp chaperone-proteases: structure and function, *Res Microbiol* (Band 160), Nr. 9, Seite 618-28.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19732826
- [208] Turgay, K.; Hamoen, L. W.; Venema, G. und Dubnau, D. (1997): Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*, *Genes Dev* (Band 11), Nr. 1, Seite 119-28.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9000055
- [209] Gründel, M.; Scheunemann, R.; Lockau, W. und Zilliges, Y. (2012): Impaired glycogen synthesis causes metabolic overflow reactions and affects stress responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Microbiology* (Band 158), Nr. Pt 12, Seite 3032-43.
- [210] van Thor, J. J.; Gruters, O. W.; Matthijs, H. C. und Hellingwerf, K. J. (1999): Localization and function of ferredoxin:NADP(+) reductase bound to the phycobilisomes of *Synechocystis*, *EMBO J* (Band 18), Nr. 15, Seite 4128-36.
- [211] van Thor, J. J. und Hellingwerf, K. J. (2002): Fluorescence resonance energy transfer (FRET) applications using green fluorescent protein. Energy transfer to the endogenous chromophores of phycobilisome light-harvesting complexes, *Methods Mol Biol* (Band 183), Seite 101-19.
- [212] Contreras-Martel, C.; Matamala, A.; Bruna, C.; Poo-Caamano, G.; Almonacid, D.; Figueroa, M.; Martinez-Oyanedel, J. und Bunster, M. (2007): The structure at 2 Å resolution of Phycocyanin from *Gracilaria chilensis* and the energy transfer network in a PC-PC complex, *Biophys Chem* (Band 125), Nr. 2-3, Seite 388-96.
- [213] Otto, H.; Lamparter, T.; Borucki, B.; Hughes, J. und Heyn, M. P. (2003): Dimerization and inter-chromophore distance of Cph1 phytochrome from *Synechocystis*, as monitored by fluorescence homo and hetero energy transfer, *Biochemistry* (Band 42), Nr. 19, Seite 5885-95.
- [214] Schmitt, F. J.; Maksimov, E. G.; Hatti, P.; Weissenborn, J.; Jeyasagar, V.; Razjivin, A. P.; Paschenko, V. Z.; Friedrich, T. und Renger, G. (2012): Coupling of different isolated photosynthetic light harvesting complexes and CdSe/ZnS nanocrystals via Förster resonance energy transfer, *Biochim Biophys Acta* (Band 1817), Nr. 8, Seite 1461-70.
- [215] Ji, Dongmei; Lv, Wei; Huang, Zhengxi; Xia, Andong; Xu, Min; Ma, Weimin; Mi, Hualing und Ogawa, Teruo (2007): Fluorescence resonance energy transfer imaging of CFP/YFP labeled NDH in cyanobacterium cell, *Journal of Luminescence* (Band 122–123), Nr. 0, Seite 463-466.
URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022231306002110>
- [216] Ma, L. und Ranganathan, R. (2012): Quantifying the rhythm of KaiB-C interaction for in vitro cyanobacterial circadian clock, *PLoS One* (Band 7), Nr. 8, Seite e42581.
- [217] Shekhawat, Sujana S. und Ghosh, Indraneel (2011): Split-protein systems: beyond binary protein–protein interactions, *Current Opinion in Chemical Biology* (Band 15), Nr. 6, Seite 789-797. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136759311100161X>
- [218] Scheer, H. und Zhao, K. H. (2008): Biliprotein maturation: the chromophore attachment, *Mol Microbiol* (Band 68), Nr. 2, Seite 263-76.

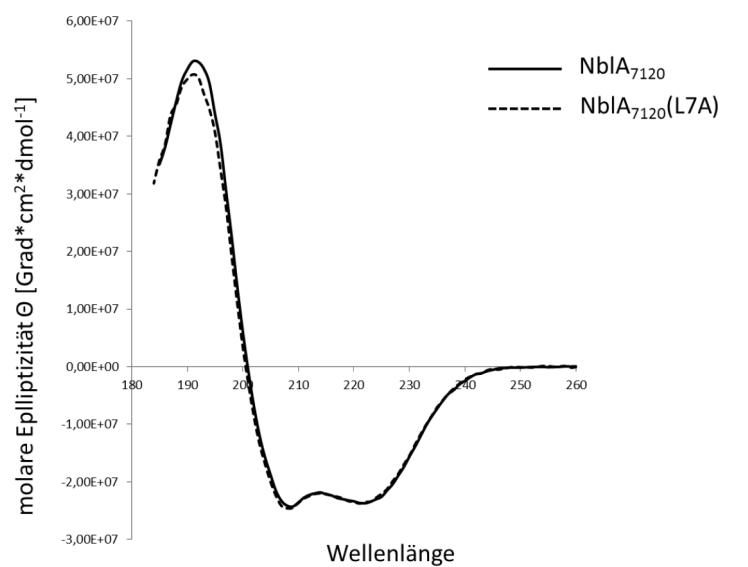
- URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18284595
- [219] Zhou, J.; Gasparich, G. E.; Stirewalt, V. L.; de Lorimier, R. und Bryant, D. A. (1992): The *cpcE* and *cpcF* genes of *Synechococcus* sp. PCC 7002. Construction and phenotypic characterization of interposon mutants, *J Biol Chem* (Band 267), Nr. 23, Seite 16138-45.
 - [220] Fairchild, C. D.; Zhao, J.; Zhou, J.; Colson, S. E.; Bryant, D. A. und Glazer, A. N. (1992): Phycocyanin alpha-subunit phycocyanobilin lyase, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 89), Nr. 15, Seite 7017-21.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1495995
 - [221] Luque, I.; Zabulon, G.; Contreras, A. und Houmard, J. (2001): Convergence of two global transcriptional regulators on nitrogen induction of the stress-acclimation gene *nbIA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Mol Microbiol* (Band 41), Nr. 4, Seite 937-47.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11532155
 - [222] Hanaoka, M. und Tanaka, K. (2008): Dynamics of RpaB-promoter interaction during high light stress, revealed by chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis in *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Plant J* (Band 56), Nr. 2, Seite 327-35.
 - [223] Kato, H.; Chibazakura, T. und Yoshikawa, H. (2008): NblR is a novel one-component response regulator in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Biosci Biotechnol Biochem* (Band 72), Nr. 4, Seite 1072-9.
 - [224] Turgay, K.; Hahn, J.; Burghoorn, J. und Dubnau, D. (1998): Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor, *EMBO J* (Band 17), Nr. 22, Seite 6730-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9890793>
 - [225] Solomon, J. M.; Lazazzera, B. A. und Grossman, A. D. (1996): Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*, *Genes Dev* (Band 10), Nr. 16, Seite 2014-24.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8769645>
 - [226] Battesti, A. und Gottesman, S. (2013): Roles of adaptor proteins in regulation of bacterial proteolysis, *Curr Opin Microbiol*. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23375660>
 - [227] Dougan, D. A.; Reid, B. G.; Horwich, A. L. und Bukau, B. (2002): ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine, *Mol Cell* (Band 9), Nr. 3, Seite 673-83.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11931773
 - [228] Clarke, A. K. und Campbell, D. (1996): Inactivation of the *petE* gene for plastocyanin lowers photosynthetic capacity and exacerbates chilling-induced photoinhibition in the cyanobacterium *Synechococcus*, *Plant Physiol* (Band 112), Nr. 4, Seite 1551-61.
 - [229] Osanai, T.; Imamura, S.; Asayama, M.; Shirai, M.; Suzuki, I.; Murata, N. und Tanaka, K. (2006): Nitrogen induction of sugar catabolic gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *DNA Res* (Band 13), Nr. 5, Seite 185-95. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17046957>
 - [230] Thompson, M. W.; Singh, S. K. und Maurizi, M. R. (1994): Processive degradation of proteins by the ATP-dependent Clp protease from *Escherichia coli*. Requirement for the multiple array of active sites in ClpP but not ATP hydrolysis, *J Biol Chem* (Band 269), Nr. 27, Seite 18209-15.
 - [231] Tryggvesson, A.; Stahlberg, F. M.; Mogk, A.; Zeth, K. und Clarke, A. K. (2012): Interaction specificity between the chaperone and proteolytic components of the cyanobacterial Clp protease, *Biochemical Journal* (Band 446), Seite 311-320. URL: <Go to ISI>://000308767500015
 - [232] Schlothauer, T.; Mogk, A.; Dougan, D. A.; Bukau, B. und Turgay, K. (2003): MecA, an adaptor protein necessary for ClpC chaperone activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 100), Nr. 5, Seite 2306-11.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12598648

- [233] Kirstein, J.; Moliere, N.; Dougan, D. A. und Turgay, K. (2009): Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases, *Nat Rev Microbiol* (Band 7), Nr. 8, Seite 589-99. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19609260
- [234] Kirstein, J.; Schlothauer, T.; Dougan, D. A.; Lilie, H.; Tischendorf, G.; Mogk, A.; Bukau, B. und Turgay, K. (2006): Adaptor protein controlled oligomerization activates the AAA+ protein ClpC, *EMBO J* (Band 25), Nr. 7, Seite 1481-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16525504
- [235] Piven, I.; Ajlani, G. und Sokolenko, A. (2005): Phycobilisome linker proteins are phosphorylated in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *J Biol Chem* (Band 280), Nr. 22, Seite 21667-72. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805115>
- [236] Vener, A. V.; van Kan, P. J.; Rich, P. R.; Ohad, I. und Andersson, B. (1997): Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome bf mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 94), Nr. 4, Seite 1585-90.
- [237] Zito, F.; Finazzi, G.; Delosme, R.; Nitschke, W.; Picot, D. und Wollman, F. A. (1999): The Qo site of cytochrome b6f complexes controls the activation of the LHCII kinase, *EMBO J* (Band 18), Nr. 11, Seite 2961-2969. URL: <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.11.2961>
- [238] Bellaïfiore, Stéphane; Barneche, Fredy; Peltier, Gilles und Rochaix, Jean-David (2005): State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7, *Nature* (Band 433), Nr. 7028, Seite 892-895. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nature03286>
- [239] Bonardi, Vera; Pesaresi, Paolo; Becker, Thomas; Schleiff, Enrico; Wagner, Raik; Pfannschmidt, Thomas; Jahns, Peter und Leister, Dario (2005): Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases, *Nature* (Band 437), Nr. 7062, Seite 1179-1182. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nature04016>
- [240] Minagawa, Jun (2011): State transitions—The molecular remodeling of photosynthetic supercomplexes that controls energy flow in the chloroplast, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* (Band 1807), Nr. 8, Seite 897-905. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272810007632>
- [241] Tikkanen, Mikko und Aro, Eva-Mari (2012): Thylakoid protein phosphorylation in dynamic regulation of photosystem II in higher plants, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* (Band 1817), Nr. 1, Seite 232-238. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272811001113>
- [242] Pribil, Mathias; Pesaresi, Paolo; Hertle, Alexander; Barbato, Roberto und Leister, Dario (2010): Role of Plastid Protein Phosphatase TAP38 in LHCII Dephosphorylation and Thylakoid Electron Flow, *PLoS Biol* (Band 8), Nr. 1, Seite e1000288. URL: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000288>
- [243] Shapiguzov, A.; Ingelsson, B.; Samol, I.; Andres, C.; Kessler, F.; Rochaix, J. D.; Vener, A. V. und Goldschmidt-Clermont, M. (2010): The PPH1 phosphatase is specifically involved in LHCII dephosphorylation and state transitions in *Arabidopsis*, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 107), Nr. 10, Seite 4782-7.
- [244] Kruse, Olaf; Zheleva, Daniella und Barber, James (1997): Stabilization of photosystem two dimers by phosphorylation: Implication for the regulation of the turnover of D1 protein, *FEBS Letters* (Band 408), Nr. 3, Seite 276-280. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579397004390>
- [245] Tikkanen, Mikko; Nurmi, Markus; Kangasjärvi, Saijaliisa und Aro, Eva-Mari (2008): Core protein phosphorylation facilitates the repair of photodamaged photosystem II at high light, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* (Band 1777), Nr. 11, Seite 1432-1437. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272808006579>
- [246] Koivuniemi, A.; Aro, E. M. und Andersson, B. (1995): Degradation of the D1- and D2-proteins of photosystem II in higher plants is regulated by reversible phosphorylation, *Biochemistry* (Band 34), Nr. 49, Seite 16022-9.

- [247] Yang, D. H.; Webster, J.; Adam, Z.; Lindahl, M. und Andersson, B. (1998): Induction of acclimative proteolysis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II in response to elevated light intensities, *Plant Physiol* (Band 118), Nr. 3, Seite 827-34.
- [248] Kirstein, J.; Dougan, D. A.; Gerth, U.; Hecker, M. und Turgay, K. (2007): The tyrosine kinase McsB is a regulated adaptor protein for ClpCP, *EMBO J.* (Band 26), Seite 2061-2070.
URL: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601655>
- [249] Xue, Y.; Ren, J.; Gao, X.; Jin, C.; Wen, L. und Yao, X. (2008): GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy, *Mol Cell Proteomics* (Band 7), Nr. 9, Seite 1598-608.
- [250] Gaspari, M. und Cuda, G. (2011): Nano LC-MS/MS: a robust setup for proteomic analysis, *Methods Mol Biol* (Band 790), Seite 115-26.
- [251] Axmann, I. M.; Duhring, U.; Seeliger, L.; Arnold, A.; Vanselow, J. T.; Kramer, A. und Wilde, A. (2009): Biochemical evidence for a timing mechanism in prochlorococcus, *J Bacteriol* (Band 191), Nr. 17, Seite 5342-7.
- [252] Kinoshita, E. und Kinoshita-Kikuta, E. (2011): Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling, *Proteomics* (Band 11), Nr. 2, Seite 319-23.
- [253] Morrison, S. S.; Mullineaux, C. W. und Ashby, M. K. (2005): The influence of acetyl phosphate on DspA signalling in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *BMC Microbiol* (Band 5), Seite 47.
- [254] Sato, H.; Fujimori, T. und Sonoike, K. (2008): sll1961 is a novel regulator of phycobilisome degradation during nitrogen starvation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *FEBS Lett* (Band 582), Nr. 7, Seite 1093-6.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18325343>
- [255] Fujimori, T.; Higuchi, M.; Sato, H.; Aiba, H.; Muramatsu, M.; Hihara, Y. und Sonoike, K. (2005): The mutant of sll1961, which encodes a putative transcriptional regulator, has a defect in regulation of photosystem stoichiometry in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Physiol* (Band 139), Nr. 1, Seite 408-16.
- [256] Akai, M.; Onai, K.; Kusano, M.; Sato, M.; Redestig, H.; Toyooka, K.; Morishita, M.; Miyake, H.; Hazama, A.; Checchetto, V.; Szabo, I.; Matsuoka, K.; Saito, K.; Yasui, M.; Ishiura, M. und Uozumi, N. (2011): Plasma membrane aquaporin AqpZ protein is essential for glucose metabolism during photomixotrophic growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803, *J Biol Chem* (Band 286), Nr. 28, Seite 25224-35.
- [257] Prepiak, P. und Dubnau, D. (2007): A peptide signal for adapter protein-mediated degradation by the AAA+ protease ClpCP, *Mol Cell* (Band 26), Nr. 5, Seite 639-47.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17560370>
- [258] Bougdour, A.; Cuning, C.; Baptiste, P. J.; Elliott, T. und Gottesman, S. (2008): Multiple pathways for regulation of [sigma]S (RpoS) stability in *Escherichia coli* via the action of multiple anti-adaptors, *Mol. Microbiol.* (Band 68), Seite 298-313.
URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06146.x>
- [259] Bougdour, A.; Wickner, S. und Gottesman, S. (2006): Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of [sigma]S stability in *Escherichia coli*, *Genes Dev.* (Band 20), Seite 884-897.
URL: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1400306>
- [260] Elhai, J. und Wolk, C. P. (1988): A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers, *Gene* (Band 68), Nr. 1, Seite 119-38.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2851487
- [261] Elhai, J. und Wolk, C. P. (1988): Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria, *Methods Enzymol* (Band 167), Seite 747-54.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3148842

- [262] Marsh, J. L.; Erfle, M. und Wykes, E. J. (1984): The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation, *Gene* (Band 32), Nr. 3, Seite 481-5.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6099327
- [263] Black, T. A. und Wolk, C. P. (1994): Analysis of a Het- mutation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 implicates a secondary metabolite in the regulation of heterocyst spacing, *J Bacteriol* (Band 176), Nr. 8, Seite 2282-92.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8157596
- [264] Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* (Band 166), Nr. 4, Seite 557-80.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6345791
- [265] Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J Mol Biol* (Band 189), Nr. 1, Seite 113-30.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3537305
- [266] Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- [267] Sambrook, J. und Russell, D.W. (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Band 3), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.
- [268] Rippka, R.; Deruelles, J.; Waterbury, J.B.; Herdman, M und Stanier, R.Y. (1979): Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria, *Journal of General Microbiology*, Nr. 111, Seite 1-61.
- [269] Rippka, R; Castenholz, R.W.; Iteman, I und Herdman, M (2001): Form-genus I. *Anabaena* Bory, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Seite 566–568, second ed. Springer, Berlin.
- [270] Goujon, M.; McWilliam, H.; Li, W.; Valentin, F.; Squizzato, S.; Paern, J. und Lopez, R. (2010): A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI, *Nucleic Acids Res* (Band 38), Nr. Web Server issue, Seite W695-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20439314>
- [271] Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Soding, J.; Thompson, J. D. und Higgins, D. G. (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol Syst Biol* (Band 7), Seite 539. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21988835>
- [272] Nicholas, K.; Nicholas, H. und Deerfield, D. (1997): GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation.
- [273] Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res* (Band 7), Nr. 6, Seite 1513-23.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=388356
- [274] Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G. und Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (Band 51 Pt 1), Seite 263-73. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3472723>
- [275] Wang, W. und Malcolm, B. A. (2002): Two-stage polymerase chain reaction protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions, and insertions, using QuikChange site-directed mutagenesis, *Methods Mol Biol* (Band 182), Seite 37-43.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11768973>
- [276] Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 74), Nr. 12, Seite 5463-7.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=271968

- [277] Schägger, H. und von Jagow, G. (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal Biochem* (Band 166), Nr. 2, Seite 368-79.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2449095
- [278] Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (Band 227), Nr. 5259, Seite 680-5.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5432063
- [279] Kyhse-Andersen, J. (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J Biochem Biophys Methods* (Band 10), Nr. 3-4, Seite 203-9.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6530509
- [280] Houmard, J.; Capuano, V.; Coursin, T. und Tandeau de Marsac, N. (1988): Genes encoding core components of the phycobilisome in the cyanobacterium *Calothrix* sp. strain PCC 7601: occurrence of a multigene family, *J Bacteriol* (Band 170), Nr. 12, Seite 5512-21.
- [281] Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* (Band 72), Seite 248-54.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=942051
- [282] Bensadoun, A. und Weinstein, D. (1976): Assay of proteins in the presence of interfering materials, *Anal Biochem* (Band 70), Nr. 1, Seite 241-50.
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1259145



A.1: CD-Spektren von NbIA₇₁₂₀ und NbIA(L7A). Aufgenommen in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,5 bei 20 °C mit einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml in einem Jasco-715 Spektropolarimeter (Jasco Instruments) Die Spektren weisen ein Minimum der molaren Ellipzität bei 209 nm, sowie bei 222 nm auf. Das einzige Maximum der molaren Ellipzität ist bei 191 nm zu erkennen.

Eigenständigkeitserklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Die dem Verfahren zugrundeliegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 30.07.2013

Publikationsliste

Publikation:

Baier A., Winkler W., Korte T. Lockau W. & Karradt A. - Degradation of the Phycobilisomes in *Synechocystis* sp. PCC6803: Evidence for an essential NblA1/NblA2 heterodimer formation – in Präparation, Veröffentlichung im *J Biol Chem* Journal geplant

Poster und Vorträge:

Antje Baier, Anne Karradt und Wolfgang Lockau (2011) Degradation of the Phycobilisomes in *Synechocystis* sp. PCC6803: Evidence for an essential NblA1/NblA2 heterodimer formation. Posterpräsentation bei der Botaniker Tagung, Berlin 18.09.-23.09.2011

Antje Baier, Anne Karradt und Wolfgang Lockau (2011) Degradation of the Phycobilisomes in *Synechocystis* sp. PCC6803: Evidence for an essential NblA1/NblA2 heterodimer formation. Posterpräsentation bei der ESF-Research-Conference - Molecular Bioenergetics of Cyanobacteria: From Cell to Community, Sant Feliu de Guixols, Spanien 10.04.-15.04.2011

Antje Baier, Anne Karradt und Wolfgang Lockau (2010) The Degradation of Phycobilisomes: Mediated by a Clp-Protease? Posterpräsentation bei der ESF-Research Conference - Bacterial Networks, Sant Feliu de Guixols, Spanien 04.09.-09.09.2010

Antje Baier, Anne Karradt und Wolfgang Lockau (2009) NblA, a key protein in the degradation process of the phycobilisomes in cyanobacteria – Vortrag beim Havel-Spree-Kolloquium 2009

Curriculum vitae

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Version nicht veröffentlicht.